STUDIEN ÜBER THROMBOZYTENAUSBREITUNG UND STATISCHE THROMBOZYTENADHÄSION UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG VON PROTEOLYTISCHEN FIBRINOGENDEGRADATIONS-PRODUKTEN, FRUKTOSEINTOLERANZ UND KONGENITALER AFIBRINOGENÄMIE

HENNING LOEPRECHT

1972

PRINT

8 München 23
Clemensstraße 27
Telefon 342149

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546014_0017

AUS DER I. MEDIZINISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. H. Schwiegk

Studien über Thrombozytenausbreitung und statische Thrombozytenadhäsion unter besonderer Berücksichtigung von proteolytischen Fibrinogendegradationsprodukten, Fruktoseintoleranz und kongenitaler Afibrinogenämie.

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Hemming Loeprecht
aus Ulm / Donau

München 1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. R. Marx
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Schwiegk
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 22.2.1972

M E I N E M V A T E R

I N D A N K B A R K E I T

G E W I D M E T

Inhaltsübersicht

I. Einleitung und Problemstellung

II. Experimenteller Teil

A) Schilderung der verwendeten Methoden

1. Blutentnahme
2. Herstellung von thrombozytenreichem- und thrombozytenarmem Plasma
3. Prinzip der Bestimmung der statischen Adhäsion und Evolution
4. Vorbereitung der Zählkammern
5. Füllen der Zählkammern
6. Waschen und Fixieren der Präparate
7. Normalwerte für Adhäsion und Evolution
8. Reproduzierbarkeit der Ergebnisse
9. Temperaturabhängigkeit der Methode bei Verwendung von Citratblut
10. Temperaturabhängigkeit der Methode bei Verwendung von Heparinblut
11. Disskussion der Methode
12. Waschen der Thrombozyten
13. Hitzefibinbestimmung
14. Thrombinzeitbestimmung
15. Fibrinnachweis mit der modifizierten Euglobulinausfällung

B) In vitro-Untersuchungen

1. Das TMG bei übernormalen Fibrinogenwerten im Plasma
2. Die Funktionsmorphologie der Thrombozyten in Gegenwart von Fibrinogenabbauprodukten, gewonnen durch Trypsin und aChymotrypsin.
   a) Wirkung der Substanzen auf gewaschene Thrombozyten
   b) Wirkung von Trasylo auf gewaschene Thrombozyten.
   c) Untersuchung der proteolytischen Aktivität der verwendeten Substanzen.
   d) Untersuchung der Temperaturabhängigkeit des Fibrinogenabbaues

e) Adhäsion und Ausbreitung der Thrombozyten in Gegenwart von Fibrinogenabbauprodukten

3. Die Funktionsmorphologie der Thrombozyten in Gegenwart von Fibrinogenabbauprodukten, gewonnen durch Plasmin.

4. Untersuchung der Fibrinogenwirkung auf die Thrombozyten in einem Fall von kongenitaler Afibrinogenämie.

5. Adhäsion und Ausbreitung bei Kindern mit Fructoseintoleranz und Beeinflussung der Ausbreitung durch verschiedene Monosaccaride.

III. Diskussion der Ergebnisse

IV. Zusammenfassung

Literaturverzeichnis

I. Einleitung

Untersuchungen über die Ursachen von Thrombosen im arteriellen und venösen Stromgebiet stellen die Funktion der Thrombozyten kausalgenetisch besonders in den Vordergrund. Wenn man aber die Geschichte der Thrombozytenforschung überblickt, ist man erstaunt über die Vernachlässigung der Plättchen während langer Jahrzehnte seit ihrer Entdeckung 1842 durch Donné.

Nachdem zuerst die Morphologie und Herkunft der Plättchen im Mittelpunkt des Interesses stand (DONNE, HAYEM, BIZZOZERO) richtete sich das Augenmerk später mehr auf die Funktion der Thrombozyten und ihre Stellung innerhalb der Hämostase. Die endgültige Namensgebung erfolgte dann 1901 durch DEKHUYZEN, entsprechend ihrer Funktion.

Die Thrombozytenpathologie begründet die Arbeit von KRAUSS (1883) über eine thrombopenische Purpura und die Veröffentlichungen von EBERTH und SCHIMMELBUSCH (1886) über die Genese von Thrombosen. Richtungsweisend war dann die Beschreibung einer Funktionsstörung der Plättchen durch GLANZMANN (1918), die er Thrombasthenie nannte. Später folgte das Aufspüren einer weiteren Thrombozytenfunktionsstörung bei gleichzeitigem plasmatischem Gerinnungsdefekt durch v. WILLEBRAND (1926).

Aufbauend auf den phasenkontrastmikroskopischen Untersuchungen der Thrombozyten durch Fonio und den elektronenmikroskopischen Studien von Wolpers und Ruska (1942), entwickelten R. MARX und seine Mitarbeiter (KÖPPEL, KÖHL, KREITER, IBROM) die Funktionsmorphologie der Thrombozyten, d. h. die Beurteilung der viskösen Metamorphose extravasaler Thrombozyten und natürlich auch deren Adhäsivität auf genormten Oberflächen. Dadurch wurde eine Methode gewonnen, die die statische Adhäsion und Ausbreitung reproduzierbar untersuchen ließ und

auch bei Thrombozytenfunktionsstörungen entsprechende morphologische Merkmale aufzeigt.

Im Verlauf dieser Arbeit soll die Wirkung des Fibrinogen (Fbg) auf die Adhäsion und visköse Metamorphose der Thrombozyten untersucht werden. Es interessierte außerdem, ob auch Fibrinogen-Spaltprodukte (FDP) noch einen Effekt auf extravasale Thrombozyten haben. Die Ergebnisse sollen kontrolliert werden an den Untersuchungsergebnissen einer Pat, mit totaler Afibrinogenämie.

II. Experimenteller Teil

A) Schilderung der verwendeten Methoden

1. Blutgewinnung

Wir verwendeten Einmalnadeln aus V2 a-Stahl der Größe 1 oder 2, sowie Einmalspritzen. Das durch Venenpunktion erhaltene Blut wurde in der Spritze mit Citratlösung (3,8 %) im Verhältnis 1 : 10 verdünnt. Dadurch war einerseits eine Aufhebung der Blutgerinnung erreicht und gleichzeitig ein möglichst geringer Citrathemmeffekt auf die Thrombozyten entsprechend den Arbeiten von IBROM, KREITER und MURR.

Für die Waschung der Thrombozyten kann als gerinnungshemmendes Mittel Sequestrene 1 % angewendet werden. Auch hier wurde das Blut bei Entnahme 1:10 mit Sequestrenelösung verdünnt. Die 1 % Sequestrenelösung wurde hergestellt, indem 1 g Titriplex (MERCK) in 100 ccm isotonischer Steriler NaCl unter leichtem Erwärmen gelöst und anschließend mit Natronlauge auf ein pH von 7,0 eingestellt wurde, Die pH-Kontrolle erfolgte mit Universalindikatorpapier Merck.

2. Herstellung von thrombozytenreichem und thrombozytenarmen Plasma.

Nach der Blutgewinnung wurde dieses in ein Zentrifugenröhrchen eingebracht und bei 1000 U/min 5 Minuten lang zentrifugiert. Aus dem thrombozytenreichen Plasmaüberstand pippetierten wir eine kleine Menge (0,3 - 0,5 ml) ab und bewahrten sie in einem gesonderten Reagenzglas auf. Das Zentrifugenglas mit dem Rest der Blutmenge wurde erneut in die Zentrifuge eingebracht und über 20 Minuten einer Umdrehungszahl von 3800 U/min ausgesetzt.

Das jetzt überstehende Plasma hoben wir ab und zentrifugierten es nochmals für 5 Minuten bei 3800 U/min. Ein Tropfen des so gewonnenen Plasma wurde nun auf einen Objektträger gegeben und im Phasenkontrastmikroskop betrachtet. Waren keine Thrombozyten im Gesichtsfeld zu finden, wurde das Plasma als thrombozytenfrei erachtet, anderenfalls erfolgte erneutes Zentrifugieren des Plasma bei 3800 U/min für 5 Minuten und erneute Kontrolle auf Thrombozytenfreiheit.

3. Prinzip der Bestimmung der statischen Adhäsion und Evolution

Es wird die Adhäsionsfähigkeit und Ausbreitungsfähigkeit (Evolution, spreading, étalement) der Thrombozyten an genormten Oberflächen untersucht. Bei dieser in vitro-Methode handelt es sich um die Untersuchung der statischen Adhäsion und Evolution auf einer Zaponlackfolie, welche auf eine Neubauer- oder Thomazählkammer aufgebracht ist. Die Methode wurde von MARX, KREITER, KÖHI und IBROM eingeführt und von WIDMER insofern modifiziert, als für die Beurteilung der Evolution nur voll ausgebreitete Thrombozyten herangezogen wurden.

Bei dem Einwirken einer thrombozytenhaltigen genormten Flüssigkeitssäule auf eine genormte Oberfläche sedimentieren die Plättchen allmählich und bleiben auf der Oberfläche, in diesem Fall Zaponlackfolie, haften. Gleichzeitig kommt es zu einer Metamorphose der Thrombozyten, die Ausdruck ihrer Vitalität ist. Nach BETTEX-GALLAND und LÜSCHER steht am Ende dieses Vorgangs der metabolische Tod der Plättchen.

Ausgehend von der Zirkulationsform der Plättchen im Blut, wo sie als rund 2 im Durchmesser große und 0,5 dicke Scheibchen sich zeigen, treten nach Extravasation Pseudopodien auf und es kommt zu einer Differenzierung zwischen einem dichten in der Mitte gelegenen Zentromer und

einem umgebenden Hyalomer. Der Endzustand in vitro im gerinnungsgehemmten System ist eine runde Scheibe von der Größe eines Granulocyten.

An Hand elektronenmikroskopischer und phasenkontrastmikroskopischer Befunde konnten Köppel und Köhl 4 Stadien genau definieren.

Stadium I : Zirkulationsform der Thrombozyten als 2 μ $\varnothing$ große Scheibchen und im Phasenkontrastmikroskop undurchstrahlbar.

Stadium II : Beginnende Pseudopodienbildung, wobei jedoch noch kein Protoplasmasaum erkennbar ist.

Stadium III : Zwischen den Pseudopodien bildet sich der Protoplasmasaum aus; die Relation Kern: Protoplasma ist nich kleiner als 1. Plättchen ist durchstrahlbar.

Stadium IV: Voll ausgebreitete Thrombozyten in runder oder Schmetterlingsform.

Die statische Adhäsion erhält man, indem die Thrombozyten gezählt werden nach Aufbringen auf die Folie und wiederum nach Fixierung und Waschen bei abgeschlossener Sedimentation. Die Zahl der adhärenten Plättchen wird angegeben in Prozenten der ursprünglich vorhandenen Thrombozyten.

Ein Maß für die Evolution ergibt sich durch Auszählen aller Plättchen, die sich im Stadium IV der viskösen Metamorphose befinden. Diese Zahl wird in Relation gesetzt zur Zahl der nach Fixation adhärenten Plättchen und in Prozenten ausgedrückt.

4. Vorbereitung der NEUBAUER- bzw. THOMA-Zählkammern

Die Kammern werden zunächst für 24 Stunden in ein Ätherbad eingelegt und anschließend mit einem äthergetränkten Leinen-

lappen kräftig abgerieben, wobei auch die tiefen Nuten zwischen den Zählkammern gesäubert wurden. Daran schloß sich ein Nachpolieren mit einem Baumwoll-Lappen an. Unter dem Miktoskop wurde jeweils kontrolliert, daß die Zählflächen frei von Zaponlackresten waren, da solche beim erneuten Auftragen des Zaponlacks Ursache für Schlierenbildung waren. Die gesäuberten Kammern wurden in eine staubfreie Plastikschachtel gelegt. Mit einem Glasstab wurde beim nächsten Arbeitsgang ein Tropfen Zaponlack (Collodium 4 % in Amylacetat) auf dem oberen Rand eines Zählfeldes der schräg gestellten THOMA- oder NEUBAUER4 Zählkammer aufgebracht, so daß sich der Tropfen gleichmäßig über das Feld verteilte und am Unterrand sammelte. Um eine möglichst dünne und gleichmäßige Zaponfolie auf der Glasunterfläche zu erreichen, war es notwendig, die überschüssige Menge des Zaponlackes am Feldunterrand sofort mit Filterpapier abzutupfen. Nach Aufbringen der Zaponfolie wurden die Kammern sofort in eine staubfreie Plastikschachtel gebracht und zum Trocknen schräg in dieser an die Wand gelehnt. Dies ist notwendig, da durch Zimmerstaub auf den Kammern, die nicht staubfrei untergebracht sind, Verunreinigungen fixiert werden, die die Beurteilung erschweren können und Verwechslungen mit nicht ausgebreiteten Thrombozyten hervorrufen.

5. Füllen der Kammern

Wie von MURR in eingegenden Untersuchungen festgestellt wurde, ist es notwendig, das thrombozytenreiche Plasma möglichst rasch nach der Blutabnahme weiterzuverarbeiten, da bereits eine Stunde nach Entnahme Störungen der Evolution auftreten können.

Nach Gewinnung des thrombozytenfreien Plasmas wurde in einer Leukopipette plättchenfreies Plasma bis zur Marke 0,5 aufgezogen und dann bis zur Marke 11 mit isotonischer

Kochsalzlösung verdünnt. Nach kräftigem Schütteln der Pipette wurden die ersten Tropfen verworfen und dann ein Tropfen in die mit einem Deckglas versehene Zählkammer nach NEUBAUER oder THOMA eingefüllt. Überstehende Flüssigkeit tupften wir mit Filterpapier ab. Auf die gleiche Weise beschickten wir auch das zweite Zählfeld der Kammer, jedoch wurde hier das thrombozytenreiche Plasma mit thrombozytenfreiem Plasma verdünnt.

Anschließend verbrachten wir die beschickten Kammern in eine feuchte Kammer (Petrischale von 20 cm Ø mit feuchtem Filterpapier ausgelegt). 15 Minuten nach Beschicken der Kammern wurde die Zahl der Thrombozyten in 5 großen Quadraten eines Zählfeldes entsprechend 80 kleinen Quadraten bestimmt.

6. Waschen und Fixieren der Präparate

Nach Ablauf von 60 Minuten wurden die Präparate in ein Drahtgestell mit der Deckfläche nach unten gehängt und in eine Petrischale mit isotonischer Kochsalzlösung gestellt. Nach wenigen Sekunden löste sich meist das Deckgläschen. Die Kammern wurden jetzt für 5 Minuten belassen, damit sämtliche Plasmateile sich von der Folie lösen konnten mit Ausnahme der adhäranten Thrombozyten.

Beim nächsten Arbeitsgang wurden die Präparate mit Osmiumsäure fixiert. 2 - 3 Tropfen einer 2 %-igen Osmiumsäurelösung kamen in ein kleines Uhrglasschälchen und dieses wiederum wurde in eine große Petrischale, die als feuchte Kammer angelegt war, gestellt. Die Kammern wurden, schräg an die Innenwand der großen Petrischale gelehnt, für 3 Minuten der Osmiumsäure ausgesetzt.

Überschüssige Osmiumsäurekristalle und Verunreinigungen wurden in einem Bad anschließend (durch Spülen) mit aqua dest. über 5 Minuten hernach abgespült. Zum Trocknen kamen die jetzt fixierten Präparate in eine staubfreie Plastikschachtel, wo sie ebenfalls schräg an die Wand gelehnt wurden. Nach Trocknen der Präparate wurde die Differenzierung der adhärenten und ausgebreiteten Plättchen in der angegebenen Weise durchgeführt.

7. Normalwerte

Thrombozytenreiches Plasma und isotonisches NaCl
Verdünnung 1 : 20

	Adhäsion %	Evolution %
1. R.E.	94,5	72,8
2. W.M.	96,0	73,5
3. H.M.	99,0	61,0
4. B.	93,5	67,0
5. F.	95,0	60,5
6. S.	98,5	59,0
7. Dr.S.	97,0	62,0
8. H.	89,0	77,0
9. B.K.	98,0	69,5
10. Dr.W.	98,5	65,0
11. A.	94,0	62,0
12. L.	93,5	60,5
13. Sr.M.	97,0	67,0
14. Sa.	95,5	59,0
15. R.	86,0	65,0
16. Ri.	86,5	59,0
17. V.	93,5	63,5
18. L.G.	87,5	69,0
19. J.	94,0	62,5
20. T.	96,5	76,0
21. G.	93,0	64,0
22. K.	97,0	70,0
23. Mo.	91,0	65,0
24. K.L.	95,5	53,0
25. Vg.	95,5	68,0
26. Dr.F.	97,0	67,5
27. Dr.T.	90,0	63,0
28. Dr.W.	95,5	67,0

Mittelwert für die Adhäsion aus 28 Werten

$\bar{m} = 94,3\ \%$

Mittlere Streuung für die Adhäsion aus 28 Werten

$s^2 = 13,014$

$s = \pm 3,6$

$2\,s = \pm 7,2$

Mittelwert für die Evolution aus 28 Werten

$\bar{m} = 61,7\ \%$

Mittlere Streuung für die Evolution aus 28 Werten

$s^2 = 54,9$

$s = \pm 7,4$

$2\,s = \pm 14,8$

Schwankungsbereich der Norm

Adhäsion	84 - 100 %
Ausbreitung	41 - 82 %

Normalwerte

Thrombozytenreiches und thrombozytenfreies Plasma
Verdünnung 1 : 20

	Adhäsion %	Evolution %
1. R.E.	90,0	65,1
2. W.M.	94,0	47,2
3. H.M.	93,3	49,0
4. L.H.	90,5	63,0
5. F.	97,5	59,0
6. S.	96,5	58,5
7. Dr. S.	94,0	59,5
8. H.L.	93,0	61,5
9. B.K.	85,5	60,5
10. Dr.W.	90,0	55,0
11. A.	88,0	55,0
12. Sr.L.	84,0	57,0
13. Sr.M.	95,0	59,0
14. Sa.	82,5	60,0
15. R.	86,0	65,0
16. Ri.	84,0	61,5
17. V.	88,0	58,0
18. L.G.	81,0	61,5
19. J.	82,0	68,0
20. T.	92,0	60,0
21. G.	93,0	78,0
22. K.	83,0	50,0
23. Mo.	89,0	59,5
24. K.L.	83,0	46,5
25. Vg.	84,5	57,0
26. Dr.F.	75,0	62,0
27. Dr.T.	82,5	62,0
28. Dr.W.	93,5	63,6

Mittelwert für die Adhäsion aus 28 Werten

$\bar{m} = 88,3\ \%$

Mittlere Streuung für die Adhäsion aus 28 Werten

$s^2 = 34,4$

$s = \pm 5,9$

$2\,s = \pm 11,8$

Mittelwert für die Evolution aus 28 Werten

$\bar{m} = 59,4\ \%$

Mittlere Streuung für die Evolution aus 28 Werten

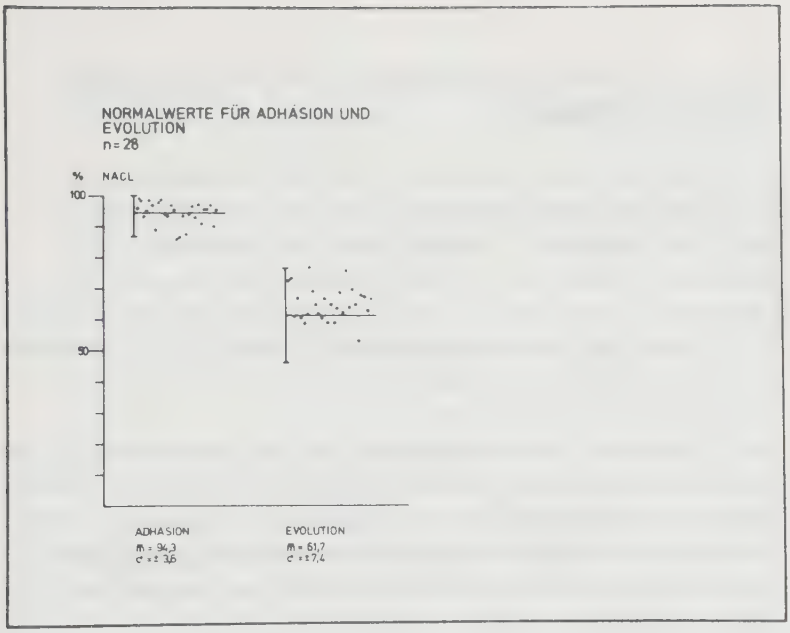
$s^2 = 41,16$

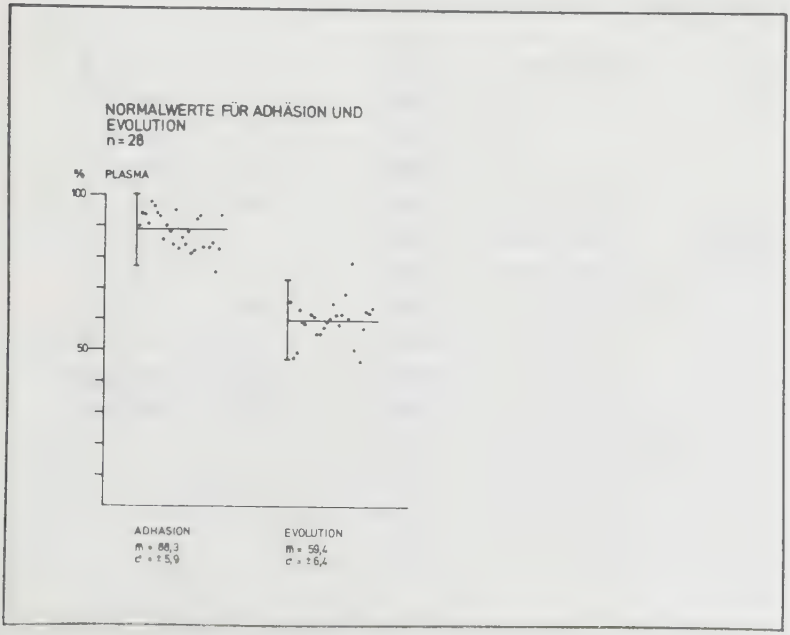
$s = \pm 6,4$

$2\,s = \pm 12,8$

Schwankungsbereich der Norm

Adhäsion	70 - 100 %
Evolution	41 - 77 %


NORMALWERTE FÜR ADHÄSION UND
EVOLUTION
n = 28
% NACL
100
50
ADHÄSION
m = 94,3
σ = ± 3,6
EVOLUTION
m = 61,7
σ = ± 7,4


NORMALWERTE FÜR ADHÄSION UND
EVOLUTION
n = 28
% PLASMA
100
50
ADHÄSION
m = 88,3
σ = ± 5,9
EVOLUTION
m = 59,4
σ = ± 6,4

8. Reproduzierbarkeit und Exaktheit der Zählergebnisse des Metamorphogramms

Es war unser Bestreben, die Methode möglichst exakt und reproduzierbar durchzuführen. Das war Anlaß dafür, aus einer Blutprobe bei gleicher Vorbereitung 5 verschiedene Kammern zu füllen und die Abweichungen der Ergebnisse festzustellen. Sollte die Methode genau sein, so durften die Ergebnisse höchstens im Bereich der Streubreite der Normalwerte schwanken.

Bei 5 gesunden Probanden wurde jeweils Citratblut 1 : 10 entnommen und sofort weiterverarbeitet. Nach der Methode plättchenreiches Plasma un d einmal isotonisches NaCl, andermal plättchenfreies Plasma als Verdünnungslösung, wurden parallel fünf Kammern gefüllt und in der beschriebenen Weise behandelt.

Ergebnisse: PRP isotonisches Na Cl

Adhäsion	1,H.L.	93,0 - 94,5 %
	2,Vg.	94,0 - 96,5 %
	3,Fr.	93,5 - 97,0 %
	4,Thi.	90,0 - 94,0 %
	5,Wu.	94,5 - 95,5 %
Evolution	1,H.L.	66,0 - 72,0 %
	2,Vg.	68,0 - 73,5 %
	3,Fr.	67,5 - 72,0 %
	4,Thi.	63,0 - 68,0 %
	5, Wu.	66,5 - 70,0 %

Ergebnisse: PRP + plättchenfreies Plasma

Adhäsion	1,H.L.	89,5 - 93,0 %
	2,Vg.	82,5 - 89,5 %
	3,Fr.	72,5 - 76,5 %
	4,Thi.	79,0 - 82,5 %
	5,Wu.	90,5 - 93,5 %
Evolution	1,H.L.	64,0 - 68,0 %
	2,Vg.	54,5 - 61,5 %
	3, Fr.	59,5 - 63,0 %
	4,Thi.	61,5 - 67,0 %
	5,Wu.	61,0 - 66,5 %

Durchschnittliche Abweichung mit Streuung

Methode: PrP + isoton. NaCl

Adhäsion	1,H.L.	$\bar{m} = 0,5$	$s^2 = 0,06$ $s = \pm 0,25$
	2,Vg.	$\bar{m} = 0,7$	$s^2 = 0,28$ $s = \pm 0,53$
	3,Fr.	$\bar{m} = 1,1$	$s^2 = 0,48$ $s = \pm 0,49$
	4,Thi.	$\bar{m} = 1,2$	$s^2 = 1,02$ $s = \pm 1,0$
	5,Wu.	$\bar{m} = 0,3$	$s^2 = 0,05$ $s = \pm 0,22$
Evolution	1,Hl.	$\bar{m} = 1,9$	$s^2 = 1,46$ $s = \pm 1,2$
	2,Vg.	$\bar{m} = 1,5$	$s^2 = 1,79$ $s = \pm 1,3$
	3,Fr.	$\bar{m} = 1,2$	$s^2 = 1,08$ $s = \pm 1,04$
	4,Thi.	$\bar{m} = 1,4$	$s^2 = 1,18$ $s = \pm 1,07$
	5,Wu.	$\bar{m} = 0,9$	$s^2 = 0,74$ $s = \pm 0,86$

Methode: PRP + plättchenfreies Plasma

Adhäsion	1,H.L.	$\bar{m} = 1,0$	$s^2 = 0,75$ $s = \pm 0,86$
	2,Vg.	$\bar{m} = 1,8$	$s^2 = 2,8$ $s = \pm 1,7$
	3,Fr.	$\bar{m} = 1,7$	$s^2 = 0,66$ $s = \pm 0,8$
	4,Thi.	$\bar{m} = 1,0$	$s^2 = 0,6$ $s = \pm 0,25$
	5,Wu.	$\bar{m} = 0,8$	$s^2 = 0,45$ $s = \pm 0,07$

Methode: PRP + plättchenfreies Plasma

Evolution:	1.H.I.	$m = 1,0$	$s^2 = 1,13$	$s = \pm 1,06$
	2,Vg.	$m = 1,8$	$s^2 = 2,97$	$s = \pm 1,75$
	3,Fr.	$m = 1,0$	$s^2 = 0,78$	$S = \pm 0,89$
	4,Thi.	$m = 2,0$	$s^2 = 0,63$	$s = \pm 0,79$
	5,Wu.	$m = 1,7$	$s^2 = 1,15$	$s = \pm 1,07$

Auf Grund dieser Untersuchungen konnte für die durchgeführte Methode eindeutig gesagt werden, daß diese zuverlässig ist und die Werte bei Vergleichsuntersuchungen sowohl in Kochsalzverdünnung, als auch in plättchenfreiem Plasma maximal um 3 % nach oben und unten um einen Mittelwert schwankten. Da bei diesen Ergebnissen nur die maximale Abweichung interessiert, ist bei den Varianzwerten nur der positive Wert wichtig.

Beim Thrombozytenmetamorphogramm besteht dem gegenüber im Normbereich eine Streubreite von 12 % um einen Mittelwert. Sollte sich also im Verlauf der Untersuchungen herausstellen, daß ein Wert bei parallelen Untersuchungen aus dem gleichen Untersuchungsmaterial um mehr als 3,5 % von einem anderen abweicht, kann mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit gesagt werden, daß dieser Wert versuchsunabhängig verändert ist.

9. Abhängigkeit der Adhäsion und Evolution von der Temperatur bei citrat-gerinnungsgehemmtem Blut

KREITER hat in seiner Dissertation bei einem Versuchsgang auch die Adhäsion und Evolution bei 0 - 4° C und bei 37° C untersucht. Bei parallelen Untersuchungen sollten diese Ergebnisse nochmals nachgeprüft und gleichzeitig ein erweiterter Temperaturbereich erfaßt werden. Ausgewählt wurden die Zimmertemperatur mit + 20° C, niedrige

Temperaturen von + 10° C und + 2° C, sowie hohe Temperaturen von + 30° C und + 37° C.

Die Laborraumtemperatur entsprach dem geforderten Wert von 20° C ± 1° C. Die Temperatur wurde jeweils bei Versuchsbeginn auf reinem Thermometer in Zimmermitte abgelesen. Für die Temperatur von + 10° C wurde folgende Anordnung gewählt: Eine 20 cm Ø große Petrischale wurde mit Wasser gefüllt und zwar so, daß bei einer kleinen hineingestellten Petrischale das Wasser nicht über den Rand floß. 3/4 Stunde vor dem Versuchsbeginn wurde die Flüssigkeit mit Eis auf + 8° C gekühlt, wobei ein Thermometer konstant in der Kühlflüssigkeit lag. Vor Versuchsbeginn wurde dann die Temperatur in der kleinen Petrischale gemessen. Dabei hatte sich die Kühlung der Flüssigkeit auf + 8° C als notwendig erwiesen, um eine Temperatur von +10° C in der kleinen Petrischale zu erreichen. Bei Kühlungsbeginn wurde auch die Zählkammer in die kleine Petrischale gelegt. Nach Versuchsende wurde die Temperatur nachgemessen.

+ 2° C erreichten wir konstant in einer Kühlzentrifuge der Marke Christ bei abgestelltem Motor durch Thermostateinstellung. Die Temperatur kontrollierten wir durch ein eingebrachtes Thermometer. Auch hier legten wir die noch ungefüllte Kammer mit Petrischale 3/4 Stunde vor Versuchsbeginn ein.

30° C konnte auf einem elektrischen Heizofen für Agarplatten erreicht werden. Die kleine Petrischale mit ungefüllter Zählkammer wurde auch hier 3/4 Stunde vor Versuchsbeginn eingebracht. Um das Temperaturgefälle auszugleichen, war es notwendig, den Thermostat auf + 33° C einzustellen. Die Temperatur kontrollierten wir vor Beginn und nach Versuchsende.

37° C konnten in einem Brutschrank eingestellt werden. Wiederum kam die Petrischale mit der leeren Neubauer-Kammer eine 3/4 Stunde vor Beginn in diesen Brutschrank. Zur Temperaturkontrolle war auch hier ein Thermometer eingelegt.

Es wurde Citratblut (1,0 : 10,0) bei sieben gesunden Versuchspersonen abgenommen und in der bereits beschriebenen Weise weiterverarbeitet. Bei jeder Temperaturstufe untersuchten wir die Adhäsion und Evolution in isoton. NaCl-Lösung-Verdünnung und in plättchenfreiem Plasma.

Ergebnisse, Mittelwerte und Streuung

Methode: PRP + isoton. NaCl 1 : 20 n = 7

Adhäsion %

+ 2° C	m = 88,4	s = 7,2	2 s = 14,4
+ 10° C	m = 93,1	s = 6,0	2 s = 12,0
+ 20° C	m = 95,2	s = 3,3	2 s = 6,6
+ 30° C	m = 92,8	s = 3,1	2 s = 6,2
+ 37° C	m = 91,0	s = 8,2	2 s = 16,4

Evolution %

+ 2° C	m = 33,9	s = 9,9	2 s = 19,8
+ 10° C	m = 48,7	s = 5,6	2 s = 11,2
+ 20° C	m = 65,7	s = 6,2	2 s = 12,4
+ 30° C	m = 49,9	s = 1,8	2 s = 3,6
+ 37° C	m = 37,1	s = 5,1	2 s = 10,2

Methode: RRP + plättchenfreies Plasma 1 : 20 n = 7

Adhäsion %

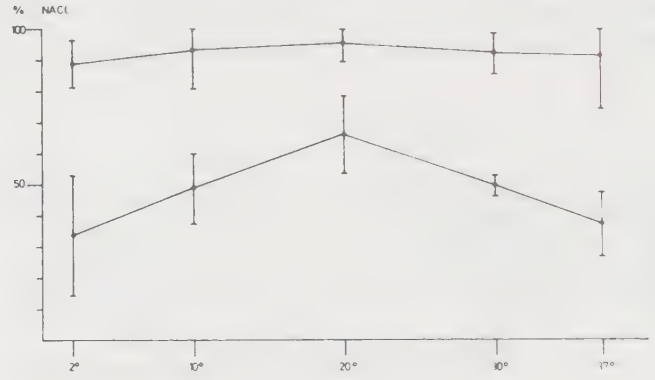
+ 20 C	m = 73,6	s = 9,1	2 s = 18,2

+ 10° C	m = 81,1	S = 8,5	2 s = 17,0
+ 20° C	m = 88,4	s = 4,6	2 s = 9,2
+ 30° C	m = 81,5	s = 13,7	2 s = 27,4
+ 37° C	m = 83,0	s = 5,2	2 s = 10,4

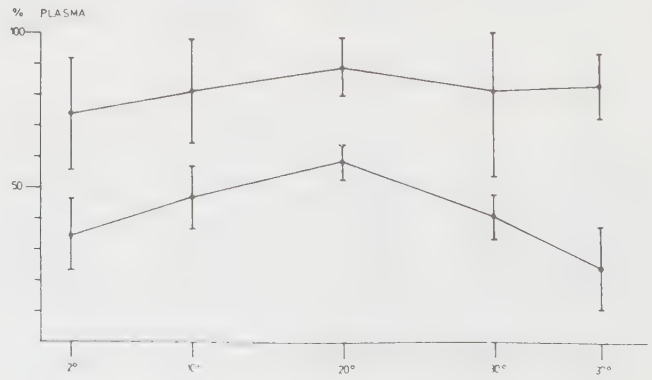
Evolution %

+ 2° C	m = 34,3	s = 5,7	2 s = 11,4
+ 10° C	m = 46,6	s = 5,1	2 s = 10,2
+ 20° C	m = 58,4	s = 2,6	2 s = 5,2
+ 30° C	m = 40,6	s = 3,7	2 s = 7,4
+ 37° C	m = 24,0	s = 6,6	2 s = 13,2

ADHASION UND EVOLUTION DER TZ BEI VERSCHIEDENEN TEMPERATUREN UNTER VERWENDUNG VON CITRATBLUT



ADHASION UND EVOLUTION DER TZ BEI VERSCHIEDENEN TEMPERATUREN UNTER VERWENDUNG VON CITRATBLUT



Aus den Ergebnissen ist zu ersehen, daß bei citrat-gerinnungsgehemmtem Blut die viskose Metamorphose einen Maximalwert bei Zimmertemperatur hat. Bei Temperaturen gegen $\pm$ 0° C ist eine deutliche Abnahme der Ausbreitung zu finden. Auffällig von der Thrombozytenmorphologie her war eine überaus starke Pseudopodienbildung. Marx und Kreiter haben dieses Phänomen als Kälte-Pseudopodienbildung klassifiziert und als Ausdruck der qualitativen Änderung der Ausbreitung gedeutet. Dies findet seine Erklärung wahrscheinlich in der Tatsache, daß nach BETTEX-GALLAND und LÜSCHER die Thrombozyten bei der viskösen Metamorphose eine enorme Stimulierung der Glykolyse mit Bildung von energiereicher ATP erfahren. Diese Vorgänge sind wie alle biochemischen Prozesse direkt temperaturabhängig und deshalb findet sich hier bei tiefer Temperatur nur eine inkomplette Ausbreitung mit der beschriebenen starken Pseudopodienbildung. Dafür spricht auch, daß unabhängig vom Inhibitormilieu (Citrat) und der unterschiedlichen Citrat-Konzentration in der NaCl-Verdünnung und Plasmaverdünnung, die Evolutionswerte sich einander nähern.

Wir haben in unserer Versuchsanordnung höhere Werte für die Ausbreitung bei + 2° C erhalten als KREITER. Eine Erklärung dafür kann darin gesehen werden, daß KREITER bei seinen Versuchen mit bereits gekühltem Spritzenmaterial zur Blutentnahme arbeitete. Unsere Intention war es aber, bei gleichen Ausgangsbedingungen, die Ausbreitung bei verschiedenen Temperaturen zu untersuchen. Auffällig ist weiterhin die große Varianz im Temperaturbereich von + 2° C, was jedoch seine Ursache darin hat, daß es schwierig war, die Thrombozyten exakt zu definieren und sehr viele Übergänge zwischen Stadium III und IV bestanden.

Für die hohen Temperaturen war es wiederum interessant, daß es hier zu einer ebenfalls starken Verminderung der

Ausbreitung kam. Aus den Versuchen geht ebenfalls hervor, daß die Hemmung im plättchenfreien Plasmamilieu deutlich stärker ist. Eine Erklärung hierfür liegt in der stärkeren Citrathemmung bei höheren Temperaturen, wie sie bereits von KREITER gefunden wurde. Die Citrathemmung bei Zimmertemperatur wurde ja von KÖHL, KREITER, IBROM und MURR in Abhängigkeit von der Konzentration deutlich belegt. Die stärkere Ausbreitungshemmung im plättchenfreien Plasma ist demnach erklärt, durch die größere Citratmenge im Verdünnungsmedium. Ebenso wie bei + 2° C fanden wir auch bei + 37° C eine höhere Evolutionszahl als KREITER, erklärbar durch die etwas andere Versuchsdurchführung. Worin die Citrathemmung der Thrombozyten bei der viskösen Metamorphose besteht, ist nicht zweifelsfrei geklärt. Denkbar ist, daß durch die Bindung von Ca^{++}-Jonen die biochemischen Prozesse verlangsamt werden.

Betrachten wir die Veränderungen der statischen Adhäsion auf der Zaponlackfolie bei den verschiedenen Temperaturen, so finden wir, daß sich diese mit kleinen Schwankungen im Normbereich bewegt und somit temperaturunabhängig ist. Die Adhäsion ist nach Untersuchungen von BOUNAMEAUX, HUGUES unabhängig von Cofaktoren. Sie ist im wesentlichen abhängig von der Oberflächenstruktur der Kontaktfläche und den besonderen Haftstrukturen der Thrombozyten. Dies zeigte sich bereits in den Versuchen von KÖHL, KÖPPEL und KREITER bei der Erarbeitung des Thrombozytenmetamorphogramms. Wenn sie also von biochemischen Vorgängen unabhängig ist, erklärt sich das Verhalten bei den verschiedenen Temperaturen eindeutig.

10. <u>Abhängigkeit der Adhäsion und Evolution von der Temperatur bei heparinisiertem Blut.</u>

Da sich bei den vorherigen Versuchen eine starke Citrathemmung temperaturabhängig fand, entschlossen wir uns die

gleichen Versuche mit heparinisiertem Blut durchzuführen. Das 1916 von MC-LEAN entdeckte Heparin hat eine starke Antithrombinwirkung, hemmt die Blutthrombokinase zusammen mit einem Plasma-Cofaktor und hemmt die Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin.

Nach einer Anregung von MARX wurde in die Spritze zur Blutentnahme 4 mg % Heparin in isoton. NaCl-Lösung in einer Menge von 2 ml vorgelegt und auf 10,0 mit Blut aufgezogen. Es wurde Heparin der Firma Novo-Industrie verwandt. Dabei entsprachen 0,1 mg gleich 10 I.E. Heparin. Zur Erreichung der 4 mg % Lösung wurde die Orginal-Heparinlösung 1 : 100 mit isoton. NaCl verdünnt. 0,2 ml enthielten 10 I.E. 0,8 ml der Verdünnung aufgefüllt mit isoton. NaCl auf 2,0 ml entsprachen der geforderten Vorlage. Das weitere Vorgehen und die Versuchsanordnung entsprach dem in vorherigen Kapitel.

Ergebnisse, Mittelwerte und Streuung

Methode: PRP + isoton. NaCl 1 : 20 n = 6

Adhäsion %

+ 2° C	m = 96,1	s = 1,7	2s = 3,4
+ 10° C	m = 97,4	s = 2,7	2s = 5,4
+ 20° C	m = 97,0	s = 2,6	2s = 5,2
+ 30° C	m = 95,6	s = 1,5	2S = 3,0
+ 37° C	m = 96,5	s = 2,0	2s = 4,0

Evolution %

+ 2° C	m = 24,2	s = 5,7	2s = 11,4
+ 10° C	m = 45,6	s = 1,8	2s = 3,6
+ 20° C	m = 64,8	s = 3,5	2s = 7,0
+ 30° C	m = 68,3	s = 2,4	2s = 4,8
+ 37° C	m = 80,1	s = 1,3	2s = 2,6

Methode: PRP + plättchenfreies Plasma 1 : 20 n = 6

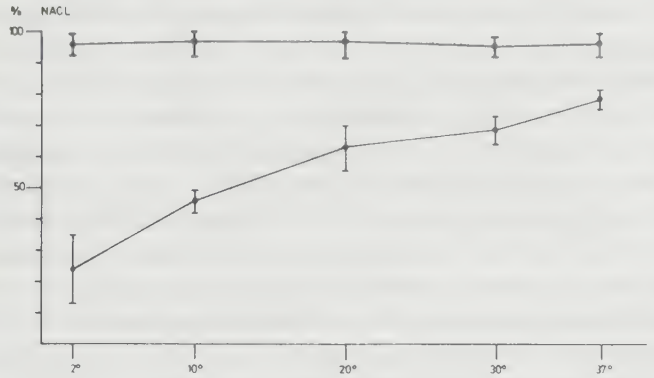
Adhäsion %

+ 2° C	m = 94,7	s = 2,5	2s = 5,0
+ 10° C	m = 95,9	s = 1,9	2s = 3,8
+ 20° C	m = 96,7	s = 1,4	2s = 2,8
+ 30° C	m = 95,3	s = 1,9	2s = 3,8
+ 37° C	m = 95,1	s = 2,4	2s = 4,8

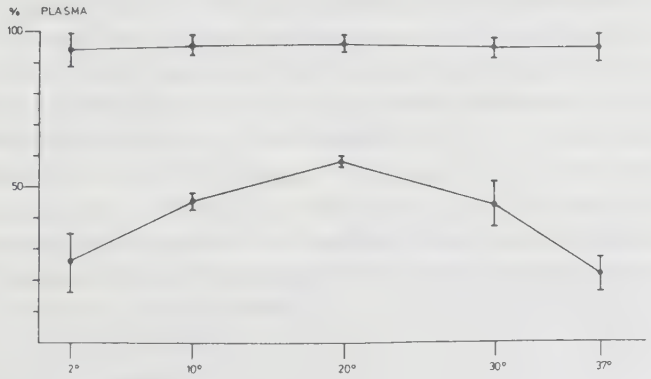
Evolution %

+ 2° C	m = 25,9	s = 4,7	2s = 9,4
+ 10° C	m = 44,4	s = 1,5	2s = 3,0
+ 20° C	m = 58,9	s = 0,6	2s = 1,2
+ 30° C	m = 44,6	s = 3,6	2s = 7,2
+ 37° C	m = 21,6	s = 2,8	2s = 5,6

ADHASION UND EVOLUTION DER TZ BEI VERSCHIEDENEN TEMPERATUREN UNTER VERWENDUNG VON HEPARINBLUT



ADHASION UND EVOLUTION DER TZ BEI VERSCHIEDENEN TEMPERATUREN UNTER VERWENDUNG VON HEPARINBLUT



Bezüglich der Adhäsion gilt auch hier die gleiche Vorstellung, die bei der Beurteilung der Adhäsion im Citrat-Milieu geäußert wurde. Innerhalb der Streubreite der Normalwerte verhielt sich die Adhäsion im gesamten untersuchten Temperaturbereich, sowohl im NaCl als auch in plättchenfreier Plasma-Verdünnung gleich. Bemerkenswert ist hier nur, daß der Mittelwert der Adhäsion in Plasma-Verdünnung etwas höher liegt und mit der Adhäsion bei NaCl-Verdünnung vergleichbar ist. Das ähnliche Adhäsionsverhalten der Blutproben, die gerinnungsgehemmt mit verschiedenen Substanzen und dies wiederum auf verschiedenen Mechanismen beruhend, läßt die Unabhängigkeit von Gerinnungsvorgängen als sehr wahrscheinlich erscheinen. Diese Ergebnisse entsprechen den Aussagen von LÜSCHER und ZUCKER, die Adhäsion der Plättchen auf körperfremden Oberflächen wie auch auf Kollagen betreffend.

Die Evolution im heparinisiertem Blut zeigte ein überaus interessantes Verhalten. Bei Temperaturen zwischen + 2° C und + 20° C war das Ergebnis ähnlich dem in citrat-versetztem Blut, und wesentlich bedingt durch die Verlangsamung biochemischer Vorgänge, morphologisch kenntlich an der reichlichen "Kälteseudopodienbildung". Die Mittelwerte der Evolution entsprachen bei Zimmertemperatur den Werten der Normalverteilung. Bei Temperaturen zwischen + 20° C und + 37° C kommt es zu einer deutlichen Trennung des Evolutionsverhaltens. In der NaCl-Verdünnung steigen die Mittelwerte der Evolution weiter an und nähern sich fast assymptotisch dem Wert von 80 %. Dem gegenüber kommt es in der Verdünnung mit plättchenfreiem Plasma zu einer erheblichen Verminderung der Ausbreitung, ganz entsprechend dem Verhalten des citratgerinnungsgehemmten Blutes. Gemeinsam war in beiden Verdünnungsmedien eine Häufung von Aggregationen.

In der NaCl-Verdünnung waren dabei die Thrombozyten ausgebreitet, im Plasmamilieu hingegen waren sie kaum evolutio-

niert, zeigten aber eine reichliche Pseudopodienbildung. In der NaCl-Verdünnung liegt insgesamt eine geringere Heparinmenge vor als in der Plasma-Verdünnung. Es ist zu diskutieren, ob Heparin einen direkten Einfluß auf die Thrombozyten ausübt oder ob dies über die Hemmung der Fibrinentstehung geschieht. Nach ROSKAM (zitiert nach Lüscher) besteht auf der Thrombozytenoberfläche eine "atmosphere plasmatique", die auch Febrinogen enthält. Fibrinogen wurde aber auch in den Thrombozyten nachgewiesen (LÜSCHER, BOUNAMEAUX). Da es sich bei Heparin um einen Thrombinantagonisten handelt, ist es zu überlegen, ob nicht durch die relative Thrombinverminderung in der NaCl-Verdünnung die Protease Thrombin ihr spezifisches Substrat wieder erreicht und somit die viskose Metamorphose verstärkt auslöst. Das Temperaturoptimum läge dann bei + 37° C. Die hier vorgelegte Heparinmenge lag noch unter der von Widmer untersuchten Konzentration von 15 mg %, deshalb war auch die Hemmung der statischen Adhäsion und Evolution geringer.

11. Diskussion der Methodik des Thrombozytenmetamorphogramms.

Nach Einführen der Methode durch MARX und seine Mitarbeiter folgten in den Jahren seit 1955 Untersuchungen über die Abhängigkeit des TMG von verschiedenen Substanzen, sowie über Veränderungen bei verschiedenen Blutungsübeln und internen Krankheitsbildern (WALKER, v. LENGERKE, ZACH, WIDMER, MURR). Sehr deutlich zeigte sich eine Abhängigkeit der Ausbreitung von der Menge der vorgelegten Citrat- oder Oxalatmenge, sowie von der Temperatur.

Nach Entnahme müssen die Blutproben rasch weiterverarbeitet werden, da nach ZACH und MURR sonst die Ausbreitung durch Alterung der Thrombozyten gestört ist. Im wesentlichen ist die Thrombozyten-Adhäsion und Evolution nach einer Stunde abgeschlossen. Auch wir konnten eine starke Temperaturab-

hängigkeit der Evolution finden wie KREITER. Bei einer Temperatur von 20° C ist jedoch das Evolutionsverhalten sehr stabil und reproduzierbar. Trotz der besseren Evolutionstendenz in heparinisiertem Blut scheint uns die Verwendung von Citratblut besser, da

1. Heparin Haltbarkeitsprobleme bietet
2. Heparin erhebliche Tz-Aggregatbildungen verursacht
3. Citrat nach MARX einen Belastungstest für die Thrombozyten darstellt.

Als Normalbereich bietet sich bei prozentual angegebenen Meßwerten nach REICH das 3-fache der Streuung an. Bei der Adhäsion in NaCl entspricht das einem Bereich von 84 - 100 %. Der entsprechende Bereich für die Adhäsion im Plasma ist 70 - 100 %.

Für die Evolution in NaCl bei einer Raumtemperatur von + 20° C fanden wir einen Mittelwert von 61,7 % und einen Normbereich zwischen 41 % und 82 %. Für die Methode PRP und plättchenfreies Plasma betragen die Werte 59,4 %, für den Normbereich 41 % bis 77 %. Beim Vergleich mit den Normalwerten von IBROM, ZACH und v. LENGERCKE konnte eine Übereinstimmung gefunden werden, lediglich die Werte bei MURR liegen höher. Auf die Angabe von grenzwertigen Bereichen wurde hier verzichtet, da bei der Angabe des Normalbereiches mit der 3-fachen Streuung ein Bereich erfaßt wird, der die eigentliche Varianz erheblich übersteigt. Zudem ist aus Parallelversuchen eine Genauigkeit der Methode mit $\pm$ 3,5 % erarbeitet.

12. Waschen der Thrombozyten

Aus Sequestreneblut (1:10) wurde thrombozytenreiches Plasma gewonnen. 1 ml davon wurde in ein Zentrifugenröhrchen pipet-

tiert und mit 2 ml 1 % Sequestrene lösung und 8 ml isoton. NaCl aufgefüllt. Danach fünf Minuten zentrifugieren bei 1700 U/min und Dekantiere des Überstandes. Die Thrombozyten finden sich als Niederschlag am Boden des Zentrifugenröhrchens. In dem minimalen Flüssigkeitsrest im Zentrifugenglas wird der Thrombozytensatz zu einer homogenen Masse aufgerührt. Anschließend wiederum Zugabe von 2 ml Sequestrene und 8 ml isoton. NaCl. Erneutes Zentrifugieren! Dieser Waschvorgang wird insgesamt dreimal wiederholt. Erfolgreich ist die Waschung, wenn sich die Thrombozyten in isoton. NaCl-Lösung nicht mehr ausbreiten. Nach der letzten Waschung werden die Plättchen in 0,5 ml isoton. NaCl. aufgenommen.

13. Hitzefibrinbestimmung nach SCHULZ

1 ml Citratplasma aus 5 ml Citratblut wird in ein Nisselröhrchen mit einer Graduierung bis 3 ml eingefüllt. Das Röhrchen wird anschließend in ein Wasserbad von 56° C für fünf Minuten gestellt. Daraufhin erfolgt scharfes Zentrifugieren bei 3800 U/min über 20 Minuten. Das denaturierte Fibrin findet sich als Niederschlag am Boden des Röhrchens. An der Graduierung wird die Menge des Niederschlags abgelesen. Aus einer Tabelle kann die Fibrinogenkonzentration entsprechend dem Niederschlag abgelesen werden. Fehler ergeben sich vor allem bei Globulinvermehrung im Plasma.

14. Thrombinzeitbestimmung

An Reagenzien werden dazu benötigt:

1. Testthrombin Behring-Werke (60 NIH pro Ampulle)
2. Aqu bidestillata
3. Citratplasma

Vor Beginn wurde das kristalline Testthrombin in 6 ml aqua bidest. aufgelöst. In ein Häkelröhrchen, welches in einem Wasserbad von 37° C stand, kamen:

0,1 ml Citratplasma
0,1 ml aqua bidest.
0,1 ml Thrombinlösung

Mit einer Platinöse wurde nun in dem Ansatz durchgezogen und die Zeit bis zum Auftreten des ersten Gerinnselfadens gestoppt. Die Normwerte lagen zwischen 14 und 20.

15. Nachweis von Fibrinogen mit einer Modifikation der Euglobulinausfällung

Das Prinzip besteht darin, daß eine peptidhaltige Lösung mit aqua bidest. verdünnt wird und bei Ansäuerung die Eiweißkörper am isoelektrischen Punkt ausfallen. Der Nachweis von Fibrinogen ist spezifisch, da es sich bei den verwandten Lösungen um reine Fibrinogenlösungen handelte und außerdem der isoelektrische Punkt für jeden Eiweißkörper einen definierten pH-Wert darstellt. Die Versuchsanordnung geht insgesamt auf eine Anregung von Prfessor MARX zurück.

Ausgegangen wirde bei den Ansätzen von den Mengen und Reagenzien wie bei der Euglobulin-Lyse Methode nach KOWARCYK und NIEWIAROWSKI. Zur Nachweisgrenze der Methode wurde in einem Versuch mit fallenden Konzentrationen von Fibrinogen gearbeitet. Fibrinogen (Behring-Werke: enthält 60 % Fibrinogen) wurde in der benötigten Menge abgewogen und in isoton. NaCl aufgelöst. 0,5 ml der Lösung wurden mit 9,5 ml aqua bidest. verdünnt und mit Essigsäure versetzt. Aus den Versuchen ergab es sich, daß die 1 %-ige Essigsäurelösung 1 : 10 verdünnt werden mußte, um eine Ausfällung zu erreichen. Die

erforderliche Menge lag bei 0,02 ml wie aus der nachfolgenden Tabelle zu ersehen ist.

Dieser Ansatz wurde jetzt für 30 Minuten im Kühlschrank bei + 4° C belassen. Daraufhin zentrifugierten wir den Ansatz 10 Minuten bei 3700 U/min und dekantierten den Überstand. Der Bodensatz wurde mit 0,4 ml isoton. NaCl und 0,075 ml Veronat-Puffer von pH 7,6 versetzt und aufgerührt. Zum Nachweis, daß es sich bei dem Niederschlag wirklich um ausgefälltes Fibrinogen handelt, kam die Lösung in einem Röhrchen in ein Wasserbad von 37° C und wurde mit 0,025 ml Thrombinlösung versetzt (60 NIH in 0,6 ml aqua bidest.). Durch Häkeln wurde die Zeit bis zum ers en Auftreten des ersten Gerinnselfadens gestoppt. Zusätzlich erfolgte noch eine Kontrolle der Lösungen unter dem Lichtmikroskop auf Fibrinfäden.

Fibrinogen-Nachweis

Nachweis von Fbg durch Ausfällung nach Art der Euglobuline

0,5 ml Lösung + 9,5 ml aqua dest. + 0,02 ml Essigsäure 1 % (1 : 10 verdünnt) 1/2 Stunde in den Eisschrank gestellt - anschließend 10 Minuten Zentrifugieren bei 3800 U/min - Überstand abgießen - 0,4 ml oder 0,15 ml NaCl zusetzen + 0,075 Veronalpuffer pH 7,6.

Diese Lösung mit dem Bodensatz mittels Glasstab vermischen, anschließend 0,025 ml Test-Thrombin (60 NIH in 0,6 ml) zusetzen. Feststellen einer Gerinnung - wenn nicht, 1/2 Stunde bei 37° C incubiert und Pipettieren eines Tropfens auf Objektträger und mikroskopische Kontrolle.

Fbg-Menge	aqua dest.	Essigsäure	Opaleszenz	Niederschlag	aufgelöst in NaCl	Gerinnung nach	Mikroskop. Kontrolle
JE 0,5 ml 200 mg %	9,5 ml	0,02 ml	++++	++++8	0,4 ml	17 sec	auf Objektträger keine Fbg-Gerinnsel oder -Nadel nachzuweisen
100 mg %	9,5 ml	"	++	++	0,4 ml	1 min 40 sec	
50 mg %	"	"	+	+	0,4 ml	3 min	
25 mg %	"	"	ø	ø	0,15 ml	ø	
12,5 mg %	"	"	ø	ø	0,15 ml	ø	
6,25 mg %	"	"	ø	ø	0,15 ml	ø	
3,125 mg %	"	"	ø	ø	0,15 ml	ø	
1,56 mg %	"	"	ø	ø	0,15 ml	ø	

B) In Vitro-Untersuchungen

1. Das Thrombozytenmetamorphogramm bei übernormalen Fibrinogenwerten im Plasma.

Ausgehend von der Tatsache, daß es bei Gravidität, Entzündung und vor allem im postoperativen Zeitraum zu Fibrinogenvermehrungen im Plasma kommt, interessierte die Frage, wie sich die Thrombozyten funktionell hierbei verhalten.

Die Untersuchung erfolgte mit Citratblut von gesunden Probanden. Nach der Hitzefibrinmethode wurde die körpereigene Fibrinogenkonzentration bestimmt. Die gewählten Fibrinogenzusätze betrugen:

a) 75 mg % Human-Fibrinogen Behring = 45 mg % reines Fibrino.
b) 250 mg % " " " =150 mg % " "
c) 500 mg % " " " =300 mg % " "
d) 750 mg % " " " =450 mg % " "

Die Korrekturwerte ergaben sich dadurch, daß Humanfibrinogen der Behring-Werke nur 60 % reines Fibrinogen enthält. Den durchschnittlichen Gesamtgehalt der Proben an Fibrinogen erhält man durch Addition der Zusatzmengen zum Durchschnittswert von 210 mg %.

Die jeweiligen Fibrinogenzusätze wurden in der Citratvorlage für die Blutentnahme gelöst, so daß die gewünschte Konzentration nach Verdünnung mit Blut und Durchmischung erreicht war. Die Weiterverarbeitung der Proben erfolgte in üblicher Weise. Untersucht wurde die Adhäsion und Ausbreitung in NaCl- und Plasma-Verdünnung.

Die Fibrinogenkonzentration der untersuchten Personen schwankte zwischen 180 mg % und 240 mg %. Für die mitt-

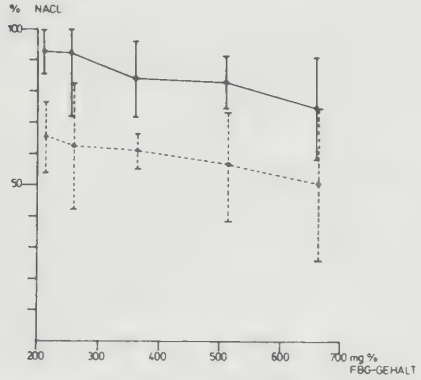
leren Konzentrationswerte gingen wir von dem Durchschnittswert von 210 mg % (n = 9) aus. Betrachtet man die doch erheblichen Fibrinogenzusätze, ist die Schwankung von 30 mg % um den Mittelwert zu vernachlässigen.

Ergebnisse

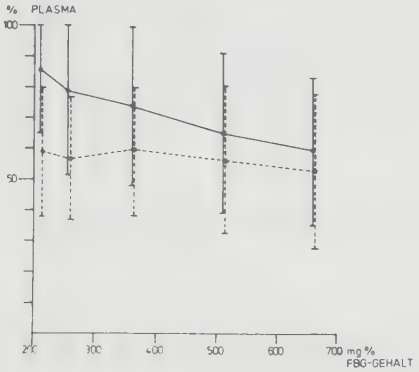
Mittelwerte aus 9 Bestimmungen

210 mg % NaCl	Adh.	$\bar{m} = 92,8$	$s = \pm 7,5$
	Evol.	$\bar{m} = 65,5$	$s = \pm 5,5$
255 mg %	Adh.	$\bar{m} = 92,3$	$s = \pm 10,3$
	Evol.	$\bar{m} = 62,8$	$s = \pm 10,8$
360 mg %	Adh.	$\bar{m} = 84,4$	$s = \pm 6,2$
	Evol.	$\bar{m} = 61,6$	$s = \pm 2,9$
510 mg %	Adh.	$\bar{m} = 83,1$	$s = \pm 4,6$
	Evol.	$\bar{m} = 57,3$	$s = \pm 9,8$
660 mg %	Adh.	$\bar{m} = 75,1$	$s = \pm 8,3$
	Evol.	$\bar{m} = 51,1$	$s = \pm 12,5$
210 mg % Plasma	Adh.	$\bar{m} = 85,4$	$s = \pm 10,9$
	Evol.	$\bar{m} = 59,2$	$s = \pm 11,5$
255 mg %	Adh.	$\bar{m} = 78,4$	$s = \pm 14,9$
	Evol.	$\bar{m} = 56,5$	$s = \pm 10,7$
360 mg %	Adh.	$\bar{m} = 73,9$	$s = \pm 13,6$
	Evol.	$\bar{m} = 59,6$	$s = \pm 10,1$
510 mg %	Adh.	$\bar{m} = 65,0$	$s = \pm 13,3$
	Evol.	$\bar{m} = 56,6$	$s = \pm 12,4$
660 mg %	Adh.	$\bar{m} = 59,3$	$s = \pm 12,3$
	Evol.	$\bar{m} = 52,7$	$s = \pm 12,7$

TZ-ADHASION UND EVOLUTION BEI
FIBRINOGEN-ZUSÄTZEN



TZ-ADHASION UND EVOLUTION BEI
FIBRINOGEN-ZUSÄTZEN



Überblickt man die Ergebnisse, so zeigt sich sowohl im Plasma als auch in der NaCl-Verdünnung eine Abnahme hauptsächlich der Adhäsion bei steigenden Fibrinogenmengen. Wesentlich geringer ist die Verminderung der Evolution. Aus beidem kann jedoch auf Grund der großen Streubreite lediglich auf eine Tendenz geschlossen werden.

Aus Untersuchungen von LÜSCHER, MURR, KREITER t. al. wissen wir, daß für die Ausbreitung Fibrinogen notwendig ist. Für die Adhäsion ist die Notwendigkeit von Fibrinogen bislang nicht nachgewiesen. Eine Zunahme der Ausbreitung war durch die Fibrinogenzusätze nicht zu erreichen. Wahrscheinlich ist für die Ausbreitung nur eine bestimmte Menge in der atmosphere plasmatique der Plättchen notwendig.

Vergleichen wir die Ergebnisse der stat. Adhäsion bei Fibrinogenzusätzen mit den Ergebnissen von GROSSPETER bei der dynamischen Adhäsion aus dem gleichen Versuchspersonenkollektiv, so zeigt sich in geradezu entgegengesetztes Verhalten: bei der statischen Adhäsion eine Abnahme, bei der dynamischen Adhäsion eine Zunahme. Ursache dafür könnte die höhere Viscosität des Plasmas bei Fibrinogenzusätzen sein, da dadurch die Sedimentationsgeschwindigkeit der Thrombozyten geringer wird (stat. Adhäsion) und die Agglomerate sich häufen, wie GROSSPETER beschreibt (dynamische Adhäsion). Ein Hinweis dafür ist auch, daß die Adhäsionsabnahme in der Plasmaverdünnung deutlicher ist. Die Lösung dieser Fragen bedürfte weiterer Klärung.

2. Funktionsmorphologie der Thrombozyten unter der Einwirkung von Fibrinogenabbauprodukten

Klinisch bekannt und von KOWALSKI beschrieben ist, daß bei plasmatischen Gerinnungsstörungen eine vaskuläre Blutung eher zu stillen ist als bei thrombozytär bedingen Hämostasestörungen. Die primäre Blutstillung im verletzten Gefäß geschieht üblicherweise durch die Bildung eines Pfropfens aus agglomerierten Thrombozyten, die dann der viskösen Metamorphose unterliegen. Sekundär kommt es zur Gerinnselretraktion durch das kontraktile Thrombosthenin (BETTEX-GALLAND, LÜSCHER), einem energieverbrauchenden Prozeß.

Fibrinspaltprodukte entstehen unter der Einwirkung von Plasmin im Blut aus Fibrin. Dieser Vorgang ist der letzte Schritt im Ablauf der Hämostase, nämlich der Abbau des Gerinnsels. In vitro und in vivo kann Plasmin durch Streptokinase, einem aus Streptokokken gewonnenen Ferment, aus der Vorstufe Plasminogen aktiviert werden. Diese Möglichkeit der Thrombolyse hat breite therapeutische Anwendung gefunden.

Widmer hat bei seinen Versuchen gefunden, daß die Evolution in durch Strptase behandeltem Plasma wenig verändert ist, dem gegenüber stärker die Adhäsion. Dem stehen Untersuchungen von KOWALSKI entgegen, der in plasmin-behandeltem Plasma eine Verminderung der dynamischen Adhäsion und viskösen Metamorphose fand.

a) Fibrinogenabbauprodukte, gewonnen durch a-Chymotrypsin und Trypsin

Unser Vorhaben war es, die Funktionsmorphologie in Abhängigkeit von Fibrinogenabbauprodukten zu untersuchen. Der Fibrinabbau kann dabei nicht nur durch das substrats-

spezifische Plasmin erfolgen, sondern auch durch andere eiweißspaltende Fermente. Auf Anregung von MARX wurde Trypsin und a-Chymotrypsin verwandt. Fermente, wie sie normalerweise im Pankreassaft enthalten sind. Diese Versuchsanordnung war so gewählt, daß mit reinen Fibrinogenlösungen und gewaschenen Thrombozyten gearbeitet wurde, um Störungen durch andere Plasmabestandteile zu vermeiden.

Der Versuchsgang im einzelnen verlief folgendermaßen: Aus Sequestreneblut (1 : 10) wurde thrombozytenreiches Plasma gewonnen und viermal gewaschen. Die Fibrinogenlösung 200 mg % erhielten wir durch Auflösen der entsprechenden Menge Human-Fibrinogen (Behring-Werke).

Bei den eiweißspaltenden Fermenten Trypsin und y-Chymotrypsin verwandten wir kristalline Präperate der Firma Boehringer. Die Substanzen wurden in 100, 10 und 1 mg % Lösung bereitgestellt. Der Verdauungsvorgang wurde durch den Proteinasenhinhibitor Trasylol in einer Konzentration von 200 E/ml gestoppt. Die FDP enthaltenden Lösungen dienten als Verdünnungsmedium der viermal gewaschenen Thrombozyten beim Metamorphogramm

Der letzte Schritt war der Nachweis, daß die Fibrinogenverdauung komplett war und nur Fibrinogenabbauprodukte vorhanden waren. In einer Reihe von Untersuchungen war außerdem zu klären, wie weit die verwandten Substanzen selbst eine Wirkung auf die Thrombozyten ausüben.

Wirkung von Trypsin und a-Chymotrypsin auf 4 x gewaschene Tz

Blut: Sequestrene 1 : 10; Lösungen 100, 10 und 1 mg %

	I.H.		Vg.	
	Adh.	Evol.	Adh.	Evol.
1. gew. Tz + NaCl	92,5	0	94,5	0
2. gew. Tz + Tz-freies Plasma	22,9	16,6	37,0	48,0

	I.H.		Vg.	
	Adh.	Evol.	Adh.	Evol.
3. gew. Tz + 100 mg % Chymotrypsin	95,0	0	96,5	0
4. gew. Tz + 10 mg % Chymotrypsin	98,0	0	87,0	0
5. gew. Tz + 1 mg % Chymotrypsin	94,5	2,9	97,5	0
6. gew. Tz + 100 mg % Trypsin	97,0	0	93,0	0
7. gew. Tz + 10 mg %	97,o	3,6	94,0	0
8. gew. Tz + 1 mg %	96,5	2,8	96,0	0

Nach diesen Ergebnissen ist die Adhäsion durch Trypsin und a-Chymotrypsin unbeeinflußt. Die Evolution liegt bei Null, wie in plasmafreiem Verdünnungsmedium zu erwarten war. Die geringe Evolution bei der ersten Blutprobe könnte auf einer Reizung der Thrombozyten beruhen. Auffallend war nämlich auch bei den anderen Proben eine Pseudopodienbildung.

b) Wirkung von Trasylol auf die gewaschenen Thrombozyten.

Citratblut 1 : 10

	Adh.	Evol.
1. Tz + NaCl	95,5	60,0
2. Tz + 100 K.I.E.	95,5	61,0
3. Tz + 200 K.I.E.	94,0	61,0
4. Tz + 400 K.I.E.	95,0	59,5

Die Trasylolmenge wurde dabei jeweils in isoton. NaCl aufgenommen. Es zeigte sich kein Einfluß des Trasylol auf die Thrombozytenfunktion.

c) Testung der Enzymaktivität der Präparate an einer 200 mg % Fibrinogen-Lösung.

Gleiche Teile der Fermentlösungen (100, 10 und 1 mg %) und der Fibrinogenlösung wurden inkubiert und 1/2 Stunde bei

Zimmertemperatur belassen. Danach wurden 200 K.I.E. Trasylol ml zugefügt.

a) Thrombinzeit: Leerwert 10 "
übrige Ansätze größer 3 '

b) Versetzen mit reichlich Thrombinlösung
Es kamen in ein Häkelröhrchen:
0,1 ml Thrombinlösung = 30 N.I.H. Testthrombin +
0,1 ml Ansatzlösung

Nach 24 Stunden Aufbewahrung im Brutschrank war Gerinnsel nur in dem Röhrchen mit einer Fibrinogenlösung und Thrombin. In den übrigen Gläschen war kein Gerinnsel festzustellen.

c) Unter Verwendung der Fbg-Nachweis-Methode mit modifizierter Euglobulin-Ausfällung.

In der früher beschriebenen Methodik wurden die Ansätze hergestellt und sofort 1/2 Stunde in einen Kühlschrank bei + 4° C gestellt. Hernach Zentrifugieren bei 3700 U/min über 10 Minuten. Ein Niederschlag fand sich in den Röhrchen mit der reinen Fbg-Lösung. Aufrütteln des Bodensatzes und Versetzen mit:

0, 1 ml Veronalpuffer pH 7,6
0,05 ml $CaCl_2$ m/40

Diese Zusätze bekamen alle Röhrchen mit Ausnahme des Röhrchens mit reiner Fibrinogenlösung, da hier bereits eine Gerinnung eingetreten war.

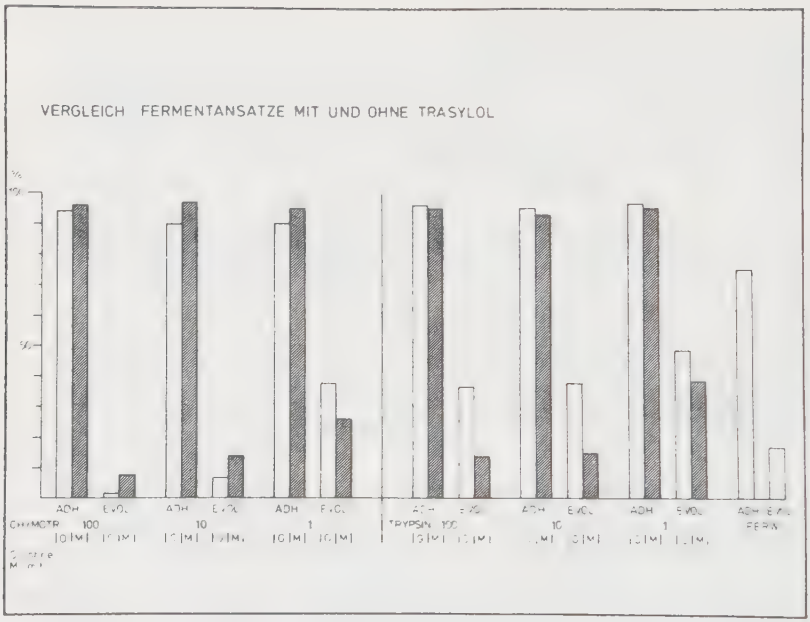
Da es auch jetzt zu keiner Gerinnselbildung kam, wurden 4 NIH Einheiten Thrombinlösung zugesetzt; darauf keine Gerinnung. Aus diesen Ergebnissen schlossen wir auf eine komplette Spaltung der Fibrinogenmoleküle. Für weitere Untersuchungen hinsichtlich des Molekulargewichts der Abbauprodukte wäre eine Ultrazentrifuge heranzuziehen.

Um zu zeigen, daß die Zugabe von Trasylol notwendig ist, führten wir einen Versuch durch, wobei die eine Hälfte der Ansätze mit Trasylol (200 K.I.E. /ml) nach 1/2-stündiger Inkubation mit Trypsin und Chymotrypsin versetzt wurde, die andere Hälfte nicht.

Thrombinzeit der Fibrinogenlösung 17,5 sec, die übrigen Ansätze hatten eine Thrombinzeit größer als 3 min.
Blut: 1 : 10 mit Sequestrene versetzt
Fibrinogenlösung 200 mg %.

Ergebnisse

	Adh. %	Evol. %
1. gew. Tz + NaCl	94,5	0.
2. gew. Tz + Fbg-Lösung	75,0	16,7
3. gew. Tz + a-Chymotrypsin 100 mg %	94,0	1,7
4. gew. Tz + a-Chymotrypsin + Trasylol	96,0	8,3
5. gew. Tz + a-Chymotrypsin 10 mg %	89,5	6,5
6. gew. Tz + a-Chymotrypsin + Trasylol	97,0	13,8
7. gew. Tz + a-Chymotrypsin 1 mg %	90,0	33,7
8. gew. Tz + a-Chymotrypsin + Trasylol	95,0	26,0
9. gew. Tz + Trypsin 100 mg %	96,0	36,4
10. gew. Tz + " + Trasylol	95,0	13,7
11. gew. Tz + " 10 mg %	95,0	37,4
12. gew. Tz + " + Trasylol	93,0	14,8
13. gew. Tz + " 1 mg %	96,5	48,2
14. gew. Tz + " + Trasylol	95,5	38,3



Das Erstaunliche bei diesem Versuch war, daß trotz der, wie aus Vorversuchen ersichtlich, fehlenden Auswirkungen von Trasylol und den Fermentansätzen auf die Thrombozyten, diese in dem Trypsin enthaltenden Ansatz ohne Trasylol eine stärkere Evolution aufweisen. Es muß sich also um eine Wirkung handeln, die an die gleichzeitig vorhandene Fibrinogen- und Trypsinlösung gebunden ist und durch Trasylolzusatz vermindert wird. Wie der Vorgang im einzelnen ist, bedarf einer weiteren Abklärung.

d) Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Temperatur.

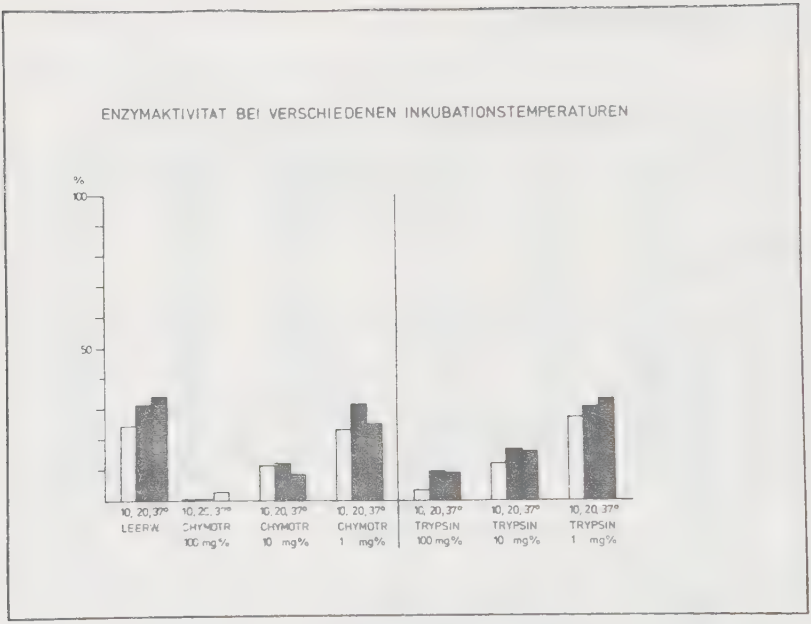
Gewählt wurden die Temperaturbereiche von 10° C, 20° C und 37° C. 10° C entsprachen der eingestellten Temperatur in einer Kühlzentrifuge mit Thermostat, wobei der Zentrifugenmotor abgestellt war.

20° C = Zimmertemperatur
37° C = Brutschranktemperatur

Die Ansätze waren die gleichen wie in den Vorversuchen.
Inkubation von 1/2 Stunde, dann Zugabe von Trasylol 200 K.I.E.
Sequestreneblut: 1 : 10, Tz = 4 x gewaschen

Ergebnisse:

		Adh. %	Evol. %
10° C	1. gew.Tz + a-Chymotrypsin 100 mg %	92,0	0
	2. gew.Tz.+ " 10 mg %	94,0	11,6
	3. gew.Tz + " 1 mg %	94,5	23,0
	4. gew.Tz + Trypsin 100 mg %	89,0	3,7
	5. gew.Tz + " 10 mg %	96,0	12,0
	6. gew. Tz+ " 1 mg %	96,0	27,0
	7. gew.Tz + Fibrinogen-Lösung	90,5	24,4
20° C	1. gew.Tz + Fibrinogenlösung	96,0	31,3
	2. gew.Tz + a-Chymotrypsin 100 mg %	97,0	2,5
	3. gew.Tz + " 10 mg %	97,5	12,0
	4. gew.Tz + " 1 mg %	99,0	31,5
	5. gew.Tz + Trypsin 100 mg %	97,0	9,9
	6. gew.Tz + " 10 mg %	96,0	16,5
	7. gew.Tz + " 1 mg %	97,0	30,5
37° C	1. gew.Tz + Fibrinogenlösung	95,0	34,0
	2. gew.Tz + a-Chymotrypsin 100 mg %	96,0	0
	3. gew.Tz + " 10 mg %	93,0	8,5
	4. gew.Tz + " 1 mg %	97,5	25,0
	5. gew.Tz + Trypsin 100 mg %	94,5	9,1
	6. gew.Tz + " 10 mg %	95,0	15,8
	7. gew.Tz + " 1 mg %	99,0	33,0


ENZYMAKTIVITAT BEI VERSCHIEDENEN INKUBATIONSTEMPERATUREN
%
100
50
10, 20, 37°
LEER W.
10, 20, 37°
CHYMOTR
100 mg%
10, 20, 37°
CHYMOTR
10 mg%
10, 20, 37°
CHYMOTR
1 mg%
10, 20, 37°
TRYPSIN
100 mg%
10, 20, 37°
TRYPSIN
10 mg%
10, 20, 37°
TRYPSIN
1 mg%

Es läßt sich aus den Versuchen eine Temperaturabhängigkeit der Fibrinogenspaltung ablesen, jedoch sind die Ergebnisse bei Temperaturen von + 20° C und 37° C wenig different voneinander. Der wesentliche Effekt scheint jedoch auf der Konzentration der Fermentlösungen im Substrat zu liegen und dem dadurch bedingten Grad der Verdauung des Fibrinogen.

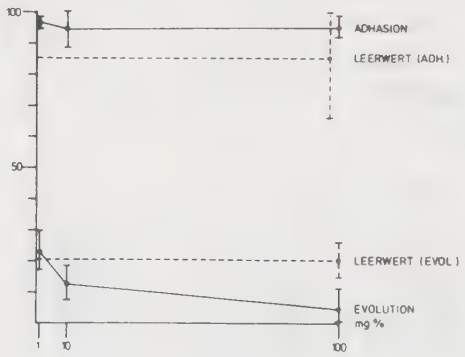
e) Adhäsion und Ausbreitung der Thrombozyten in Gegenwart von Fibrinogenabbauprodukten.

Nach Abschluß der Vorversuche wurde unter den ermittelten Bedingungen bei 3 gesunden Probanden Sequestreneblut (1:10) entnommen. Das plättchenreiche Plasma wurde viermal gewaschen und die Thrombozyten abschließend in isoton. NaCl aufgenommen, 200 mg % Fibrinogenlösung (Behring-Werke) wurde mit a-Chymotrypsin und Trypsin versetzt und 1/2 Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach dieser Zeit wurde den Ansätzen Trasylol (200 K.I.E. /ml) zugesetzt. Für das Metamorphogramm wurde in einer Leukopipette gewaschene Thrombozyten und die jeweiligen Ansätze gemischt.

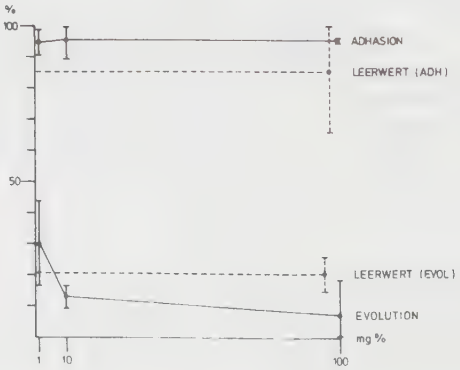
Ergebnisse: n = 3

	Adh. %	Evol. %
1. gew.Tz + Fibrinogenlösung	$\bar{m}$=85,6 s=$\pm$ 9,5	$\bar{m}$=20,6 s=$\pm$2,8
2. gew.Tz + a-Chymotrypsin 100 mg %	$\bar{m}$=95,2 s=$\pm$ 1,9	$\bar{m}$= 4,3 s=$\pm$3,5
3. gew.Tz + " 10 mg %	$\bar{m}$=94,6 s=$\pm$ 3,2	$\bar{m}$=12,5 s=$\pm$2,8
4. gew.Tz + " 1 mg %	$\bar{m}$=96,0 s=$\pm$ 1,0	$\bar{m}$=23,3 s=$\pm$3,1
5. gew.Tz + Trypsin 100 mg %	$\bar{m}$=95,2 s=$\pm$ 0,3	$\bar{m}$= 7,4 s=$\pm$5,8
6. gew. Tz+ Trypsin 10 mg %	$\bar{m}$=95,6 s=$\pm$ 3,1	$\bar{m}$=13,2 s=$\pm$1,6
7. gew.Tz + Trypsin 1 mg %	$\bar{m}$=94,5 s=$\pm$ 2,2	$\bar{m}$=30,4 s=$\pm$6,8

ADHASION UND EVOLUTION IN FDP-LOSUNG
GEWONNEN DURCH CHYMOTRYPSIN



ADHÄSION UND EVOLUTION IN FDP-LOSUNG
GEWONNEN DURCH TRYPSIN



Aus diesen Versuchsergebnissen ist zu schließen, daß die Evolution der Thrombozyten auch durch Fibrinogenabbauprodukte noch wesentlich gefördert wird. Die Adhäsion im statischen System an Zaponlack bleibt vom Fibrinogengehalt unabhängig. Nach den hier verwendeten Nachweismethoden war kein Fibrinogen mehr zu finden; jedoch war nicht zu klären, welche Molekülgröße die Abbauprodukte hatten. Diesbezügliche Aufschlüsse sind nur mit Hilfe der Ultrazentrifuge und immunologischer Nachweismethoden zu gewinnen. Ein auffälliger Befund war auch die Evolutionsförderung bei gleichzeitigem Vorhandensein von Fibrinogen und Trypsin ohne Trasylol-Hemmung der Proteolyse. Dieser Befund bedarf jedoch weiterer Nachprüfung.

3. Fibrinogenabbauprodukte, gewonnen durch Plasmin.

Wie Eingangs dieses Abschnitts erwähnt, erfolgt die körpereigene Fibrinolyse durch Plasmin, welches aus der Vorstufe Plasminogen durch Blut- bzw. Gewebefaktoren freigesetzt wird. Hierbei ist das Fibrinogen das spezifische Substrat im Gegensatz zu den vorangegangenen Versuchen, wo keine spezifische Bindung zum Substrat bestand.

Prinzipiell wurde mit der gleichen Versuchsanordnung gearbeitet, um Vergleichsmöglichkeiten zu haben. Deshalb auch hier der folgende Ablauf: vermal gewaschene Thrombozyten aus Sequestreneblut (1:10). Verdauen einer 200 mg % Fibrinogenlösung (Fibrinogen Behring-Werke) durch Plasmin. Abstoppen der Peptidspaltung durch Trasylol (200 K.I.E.). Schließlich Beschicken der Zählkammern mit den einzelnen Ansätzen in der bekannten Weise.
Auch hier waren einige Vorversuche notwendig, um die Wirkung der Substanzen selbst auf die Thrombozyten und die Fibrinogenlösung zu erfassen.

Im Vordergrund stand dabei die Untersuchung der Fermentaktivität des Plasmin. Bei unseren Untersuchungen verwandten wir Plasmin Novo-sterile (porcine Plasmin) der Firma Novo-Industri. In 10 ml waren 21 E. enthalten. Die Kontrolle auf Fibrin geschah durch Thrombinzeit-Bestimmung.
Thrombinzeit der Fibrinogenlösung: 13 sec.
Es wurden zunächst inkubiert:
1 ml Fibrinogenlösung + 0,1 ml Plasmin (0,21 E.)
Jeweils in 5-Minuten-Abständen wurde bis zum Ablauf von 30 Minuten aus einem Ansatz die Thrombinzeit bestimmt. Dabei war zu jedem Zeitpunkt die Thrombinzeit größer als 3 Minuten.
Beim nächsten Untersuchungsgang arbeiteten wir mit fallenden Plasminmengen. Die Ansätze wurden bei Zimmertemperatur (+23° C) fünf Minuten belassen und dann die Thrombinzeit bestimmt. Auch bei dieser Versuchsdurchführung war die Thrombinzeit immer größer als 3 Minuten. Deshalb verdünnten wir die Orginal-Plasminlösung 1:10 so, daß 0,1 ml = 0,021 E. entsprachen.

	Thrombinzeit
Fbg.-Lösung + 0,1 ml Plasmin (1:10	30 sec
Fbg.-Lösung + 0,08 ml Plasmin	28 sec
Fbg.-Lösung + 0,06 ml "	20 sec
Fbg.-Lösung + 0,04 ml "	15 sec
Fbg.-Lösung + 0,02 ml "	15 sec

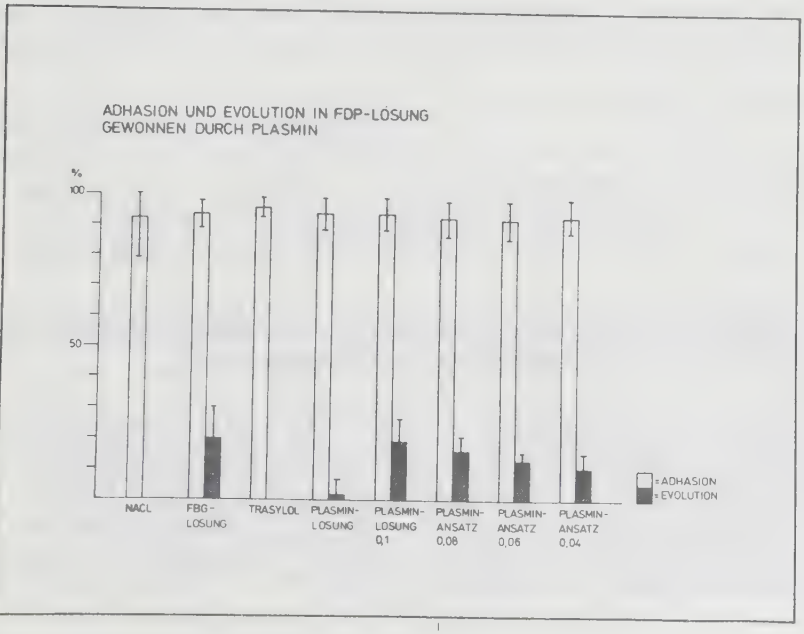
Auf Grund dieser Ergebnisse entschlossen wir uns, für die eigentlichen Untersuchungen 0,1, 0,08, 0,06 und 0,04 ml der Orginalplasminlösung zu verwenden, da hierbei eine ausreichender Fibrinogenabbau gewährleistet schien, d. h. die Thrombinzeit war praktisch unendlich.

Die Kontrolle der Wirkungen der benötigten Substanzen auf die Thrombozytenfunktion haben wir in den Versuchsgang mit eingebaut. Die Ergebnisse sind aus der später folgenden Tabelle ersichtlich.

Die eigentliche Versuchsreihe erfolgte mit Sequestroneblut (1:10) von 6 gesunden Medizinstudenten. Die Inkubationsdauer mit Plasmin betrug fünf Minuten. In der folgenden Tabelle sind die Mittelwerte mit Schwankungsbreite angegeben.

Ergebnisse: n = 6

	Adh. %	Evol. %
1. gew.Tz + NaCl	$\bar{m}$= 92,3 s=$\pm$ 6,5	$\bar{m}$= 0
2. gew.Tz + Fibrinogenlösung	$\bar{m}$= 93,4 s=$\pm$ 2,2	$\bar{m}$=19,7 s=$\pm$5,0
3. gew.Tz + Trasylol	$\bar{m}$= 95,7 s=$\pm$ 1,6	$\bar{m}$= 0
4. gew.Tz + Plasmin 0,1	$\bar{m}$= 93,7 s=$\pm$ 2,6	$\bar{m}$= 1,9 s=$\pm$2,5
5. gew.Tz / Fbg + Plasmin 0,1	$\bar{m}$= 93,7 s=$\pm$ 2,6	$\bar{m}$=19,3 s=$\pm$3,6
6. gew.Tz + Plasmin + Fbg 0,08	$\bar{m}$= 92,4 s=$\pm$ 2,8	$\bar{m}$=16,2 s=$\pm$2,3
7. gew.Tz + Fbg / Plasmin 0,06	$\bar{m}$= 92,0 s=$\pm$ 3,1	$\bar{m}$=13,0 s=$\pm$1,4
8. gew.Tz + Fbg + Plasmin 0,04	$\bar{m}$= 92,8 s=$\pm$ 2,9	$\bar{m}$=10,4 s=$\pm$1,9



Das Wesentliche aus den Ergebnissen ist wiederum, daß die Adhäsion der Plättchen an Zaponlack-Oberflächen völlig unabhängig ist von der Fibrinogenmenge oder anderer Substanzen. Dies bestärkt wiederum die Ansicht, daß die Adhäsion ein Vorgang ist, der nicht von plasmatischen gerinnungsphysiologischen Vorgängen abhängt.

Geradezu erstaunlich ist aber das Verhalten der Evolution in einem Medium, welches Fibrinogenabbauprodukte enthält. Erstens scheint Plasmin selbst eine geringe evolutionsfördernde Eigenschaft zu besitzen. Zweitens ist die Evolutionsrate gerade in den Ansätzen am höchsten, der auch die größte Menge Plasmin enthält (0,1 ml). Es zeigen sich hier Parallelen zu der Beobachtung, daß Trypsin und Fibrinogenlösung zusammen eine erhebliche evolutionsfördernde Eigenschaft besitzen. Hier ist es aber nicht eine Einzelbeobachtung, sondern in einer Versuchsreihe gewonnen und somit auch repräsentativ. Plasmin-Novo enthält eine Spur Trypsin. Wahrscheinlich beruht der beobachtete Effekt auf diesen Zusatz.

Fibrinogen mußte in diesen Ansätzen mit Plasmin verdaut sein, denn die Thrombinzeit war in jedem Fall größer als 3 Minuten. Weiterhin ist zu berücksichtigen, daß es sich bei den gewaschenen Thrombozyten um stark maltraitierte Plättchen handelt und trotzdem es zu einer guten Ausbreitung kommt.

4. <u>Untersuchung der Fibrinogenwirkung auf die Thrombozyten bei einem Fall von kongenitaler Afibrinogenämie.</u>

Seit der Beschreibung des ersten Falles einer kongenitalen Afibrinogenämie durch Rabe und Salomon 1920 wurde in der Folgezeit durch verfeinerte Untersuchungsmethoden dieses Krankheitsbild häufiger beschrieben. In der Fallzusammenstellung aus der Literatur bei KOUFAS und BÖMMER ist eine Übersicht über ca. 60 Fälle gegeben.

Nach diesen Befunden ist die Afibrinogenämie gekennzeichnet durch eine völlige Ungerinnbarkeit des Blutes. Weiterhin handelt es sich um eine nicht geschlechtsgebundene rezessive Erbkrankheit, wobei nur homozygote Erbträger eine Afibrinogenämie zeigen. Es kommt zum homozygoten Genbestand, wenn die Elternteile heterozygot sind.

Man kennt bei diesem Krankheitsbild eine Früh- und Spätmanifestation. Frühmanifestation heißt, daß das Krankheitsbild sich bereits in den ersten Lebenstagen mit Nabelschnur-Blutungen, multiplen Hämatomen, Kephalhämatomen, Darmblutungen, Hämatemesis, Nasenbluten und Vaginalblutung bemerkbar macht. Diese Blutungen können bedrohliche Ausmaße annehmen und vor allem bei Einblutung in parenchymatöse Organe zum Tod führen.

Sind die kritischen ersten Lebenstage überstanden, so sind die Erscheinungen der Spätmanifestation weit geringer. Es sind dies vor allem Hautekchymosen bei stumpfen Bagatelltraumata, Zahnextraktionsblutungen und erhebliche Nachblutungen bei Schnittverletzungen.

Abzugrenzen ist die kongenitale Afibrinogenämie gegen sekundäre Hypo- bzw. Afibrinogenämien z. B. bei DIC.

Hämatologisch findet man konstant eine fehlende Blutkörperchen-Senkung (Werte liegen nach 1 und 2 Stunden meist zwischen 1 und 2 mm). Die korpuskulären Bestandteile des Blutes rangieren im unteren Normbereich, ebenso auch die Thrombozyten. Hämostaseologisch kann oft eine Verlängerung der Blutungszeit nachgewiesen werden (53,6 %). In einigen Fällen wurden niedrige Werte für die Gerinnungsfaktoren VII und IX gefunden. Die Vorphasengerinnung ist aber nicht gestört. Ungestört ist auch Aggregation der Thrombozyten nach ADP-Zusatz. Die Plätt-

chen zeigen nach Untersuchungen von GUGLER - LÜSCHER und CAEN - INCEMAN keine viskose Metamorphose und sind unfähig, an Glas zu adhärieren. Eine vaskuläre Blutung kann dabei noch durch einen Plättchenthrombus an Collagen zum Stehen gebracht werden, der Plättchenthrombus verfestigt sich jedoch nicht. Diese Befunde erklären auch, daß es trotz beschriebener Hämarthrosen nie zur Ausbildung von Blutergelenken kommt, weil ja eine bibröse Umwandlung eines Gerinnsels nicht stattfinden kann.

Bei dem in Folgenden beschriebenen Fall handelte es sich um ein zum Zeitpunkt der Untersuchung 7-jähriges Mädchen, bei welchem es mit 3 Jahren nach einem Sturz von einem Traktor zu ausgedehnten Ekchymosen kam. Es handelte sich also um die Spätmanifestation einer kongenitalen Afibrinogenämie. Bei den Eltern und in der Familie ist keine Blutungsdiathese bekannt.

Bei einer ersten Untersuchung wegen der Hämostasestörung 1966 wurden folgende Befunde erhoben:
BKS 1/1; Thrombozyten 225.000; PI = nicht bestimmbar; Serum-Plasma und PTA-Bigga normal, Thrombinzeit größer 2 Minuten. Mit der Hitzefibrinierung und im Ouchterlony-Test mit Antifibrinogen-Serum war kein Fibrin nachzuweisen.

Die Aggregation der Thrombozyten nach Zusatz von ADP in einer Konzentration von 0,5 und 1,0 ml war bei mehrfachen Kontrollen normal.

Bei einer erneuten Untersuchung des Kindes im Juni 1968 interessierte vor allem die Rolle des Fibrinogen bei der statischen Adhäsion und Evolution. Es wurde sowohl Citratblut (1 : 10) als auch Sequestreneblut (1 : 10) für die Waschung der Thrombozyten entnommen.

Kontrolle auf Fibrinogen: Im Plasma war mittels der Hitzedefibrinierung kein Fibrin nachzuweisen, im Ouchterlony-Plattentest fanden sich jedoch geringe Spuren von Fibrinogen. Es handelte sich also bei dem Kind jetzt um einen Fall von inkompletter Afibrinogenämie bzw. hochgradiger Hypofibrinogenämie.

Das Citratplasma wurde zur Gewinnung von plättchenreichem und -freiem Plasma sofort weiterverarbeitet. Das thrombozytenreiche Sequestreneplasma wurde zweimal gewaschen (ein Teil 1 : 10, der andere Teil 1 : 93) und die Plättchen anschließend wieder in NaCl aufgenommen.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Aufstellung zusammengefaßt.

1. Normale Adhäsion und Evolution		
NaCl:	Adh. 58,0 %	Evol. 16,2 %
Plasma:	Adh. 10,1 %	Evol. 0,0 %
2. Citrat-Tz + Fbg-Zusätze in Tz-freiem Eigenplasma - 200 mg % Fbg:	Adh. 92,5 %	Evol. 47,5 %
100 mg % Fbg:	Adh. 81,5 %	Evol. 45,5 %
3. Zweimal gew. Tz in Eigenplasma + NaCl oder Fbg oder ADP (1 g/ml) - Waschung 1 : 10 Tz in NaCl + NaCl:	Adh. 93,5 %	Evol. 0,0 %
Tz in Eigenplasma + Tz-freies Eigenplasma	Adh. 6,0 %	Evol. 0,0 %
Tz in Eigenplasma + Tz-freies Eigenplasma + 200 mg % Fbg	Adh. 89,5 %	Evol. 52,0 %
Tz in Eigenplasma + Tz-freies Eigenplasma + 100 mg % Fbg	Adh. 76,5 %	Evol. 54,5 %
Tz in Eigenplasma + Tz-freies Eigenplasma + ADP 1 y/ml	Adh. 25,4 %	Evol. 0,0 %
4. Zweimal gew. Tz in Eigenplasma + NaCl	Adh. 69,0 %	Evol. 10,1 %
5. Zweimal gew. Tz in NaCl + NaCl oder Plasma		
Waschung 1 : 93		
NaCl	Adh. 95,0 %	Evol. 0,0 %
Plasma	Adh. 9,5 %	Evol. 0,0 %
6. Zweimal gew. Tz einer blutgruppengleichen Normalperson in NaCl oder Plasma - NaCl	Adh. 93,5 %	Evol. 0,0 %
Plasma	Adh. 65,0 %	Evol. 25,2 %
7. Zweimal gew. Tz Normalperson in NaCl + Afibrinogenämieplasma	Adh. 2,7 %	Evol. 0,0 %
Zweimal gew. Afibrinogenämie Tz in NaCl + Plasma Normalperson	Adh. 94,8 %	Evol. 57,0 %

Aus diesen Untersuchungen kann man ableiten, daß neben der schweren Hämostasestörung, verursacht durch den Fibrinogenmangel, kein Hinweis besteht auf ein im Plasma lokalisiertes Inhibitorsystem. Der Zusatz von ADP im statischen System der Thrombozytenadhäsion kann keine verwertbaren Befunde liefern, weil die Agglomerate auf der Folie beim "Waschen" leichter abfallen. Eine Beeinflussung der statischen Adhäsion bei dem Krankheitsbild der A- bzw. Hypofibrinogenämie im Citratplasma ist in diesem Fall zumindest vorhanden und bei mehreren Kontrollen bestätigt.

Während bei den gewaschenen Thrombozyten in NaCl-Verdünnung eine durchwegs gute Adhäsivität zu beobachten war, wurde diese aber bei Zusatz von Thrombozytenfreiem, citrathaltigem Afibrinogenämieplasma erheblich herabgesetzt. Mit großer Wahrscheinlichkeit wird die statische Plättchenadhäsion durch Citrat gehemmt ("Belastungstest").

Die Ausbreitung der Plättchen ist ebenfalls schwer gestört, kann aber nach Zusatz von Fibrinogen oder gruppengleichem Plasma völlig normalisiert werden.

5. Beeinflussung der Thrombozyten-Ausbreitung durch verschiedene Monosaccharide

Wir hatten die Gelegenheit, das Blut von zwei Brüdern mit hereditärer Fructoseintoleranz auf das Vorliegen einer Thrombozytenfunktionsstörung zu untersuchen. Die Kinder befanden sich in stationärer Behandlung der Universitäts-Kinder-Klinik München.

Es handelt sich bei dieser Erkrankung um eine Störung der Glykolyse, verursacht durch das Fehlen der 1-Phospho-Fructaldolase. Dadurch unterbleibt die Spaltung von Fructose-1-Phosphat im Glycerinaldehyd und Dihydroxy-Acetonphosphat

und es kommt zur Anhäufung von Fructose-1-Phosphat im Blut. Bei den betroffenen Kindern findet man an Symptomen Schwindel, Blässe, Schweißausbruch und Somnolenz nach dem Genuß von fructosehaltigen Speisen. Die Krankheitserscheinungen werden durch eine Hypoglykämie bei gleichzeitiger Fructosämie hervorgerufen.

Im Thrombozytenmetamorphogramm fanden wir folgende Befunde:

I,V.W.

Thrombozytenzahl:		298.000
NaCl	Adh.	91,0 %
	Evol.	30,9 %
Plasma	Adh.	73,0 %
	Evol.	16,7 %

II,V.B.

Thrombozytenzahl:		335.000
NaCl	Adh.	89,5 %
	Evol.	33,5 %
Plasma	Adh.	83,5 %
	Evol.	27,4 %

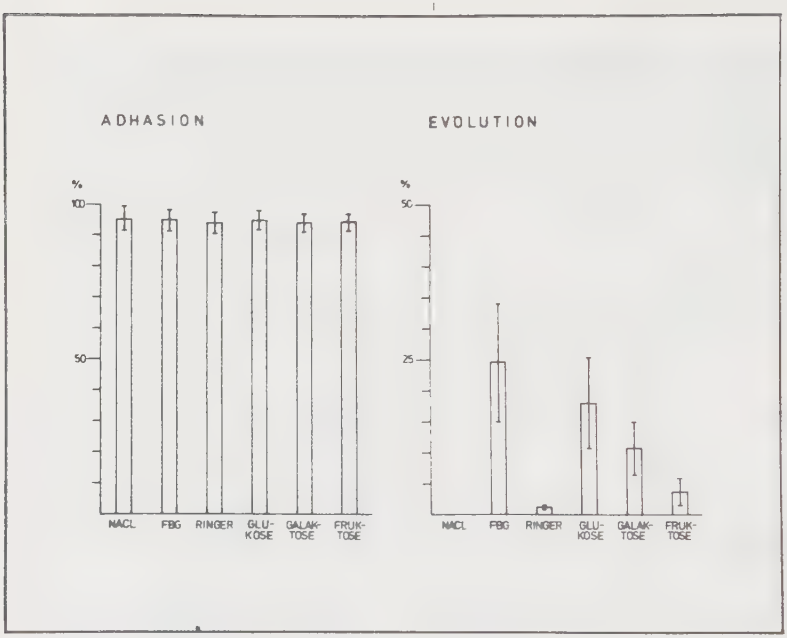
Da hier die Ausbreitung pathologisch war, ohne Formanomalie der ausgebreiteten Plättchen, interessierte uns die Frage, inwieweit gewaschene Plättchen auf zugesetzte Monosaccharidelösungen ansprechen. Das vor allem deswegen, weil die visköse Metamorphose unter gleichzeitiger Glykolyse abläuft. Für die Untersuchungen wurden 100 mg %-lösungen von Glucose, Fructose und Galactose durch Auflösung handelsüblicher Präparate in Ringerlösung hergestellt. Zum Vergleich mit der Ausbreitung bei normalem Fibrinogengehalt setzten wir noch einen Versuchsgang mit einer 200 mg % Fibrinogenlösung an.

Glucose: Traubenzuckerlösung 5 %-Delte-Pharma^{R}
Galactose: D (+)-Galactose z. Leberfunktionsprüfung, Merck^{R}
Fructose: Laevosan 20 %, Laevosan^{R} -Mannheim
Fibrinogen: Humanfibrinogen - Behring-Werke^{R}

Ergebnisse: n = 8 Tz : 4 x gewaschen

NaCl	Adh.	$\bar{m}$ = 95,0 %	s^2 = 3,6	s = ± 1,9
Fbg	Adh.	$\bar{m}$ = 94,9 %	s^2 = 2,9	s = ± 1,7
	Evol.	$\bar{m}$ = 24,6 %	s^2 =23,9	s = ± 4,9
Ringer	Adh.	$\bar{m}$ = 93,9 %	s^2 = 2,5	s = ± 1,6
	Evol.	$\bar{m}$ = 2,4 %	s^2 = 0,5	s = ± 0,23
Glucose	Adh.	$\bar{m}$ = 94,8 %	s^2 = 2,7	s = ± 1,6
	Evol.	$\bar{m}$ = 18,1 %	s^2 =13,9	s = ± 3,7
Galactose	Adh.	$\bar{m}$ = 93,9 %	s^2 = 2,2	s = ± 1,5
	Evol.	$\bar{m}$ = 10,7 %	s^2 = 4,4	s = ± 2,1
Fructose	Adh.	$\bar{m}$ = 94,4 %	s^2 = 1,2	s = ± 1,1
	Evol.	$\bar{m}$ = 3,8 %	s^2 = 1,03	s = ± 1,0

Es fand sich hier somit eine deutliche Beeinflussung der Evolution durch die Art des Monosaccharides. Am besten war die Ausbreitung in Glucose, geringer in Galactose und am schlechtesten mit Fructose. Eine geringe Ausbreitung war in der reinen Ringerlösung vorhanden gegenüber keiner Ausbreitung in der isotonischen NaCl-Lösung.


ADHASION
%
100
50
NACL
FBG
RINGER
GLU-KOSE
GALAK-TOSE
FRUK-TOSE
EVOLUTION
%
50
25
NACL
FBG
RINGER
GLU-KOSE
GALAK-TOSE
FRUK-TOSE

Diskussion der Ergebnisse

1. Bei den methodologischen Untersuchungen über das Thrombozytenmetamorphogramm konnte eine signifikante Temperaturabhängigkeit festgestellt werden. Unter Verwendung von Citratblut ist bei einer Temperatur von + 2° C die erhebliche Verminderung der Evolution zu erklären durch eine Verlangsamung der Glykolyse, die nach BETTEX-GAILAND und LÜSCHER die Energie liefert für die viskose Metamorphose. Gleichfalls konnten die Untersuchungen von KREITER in einer geänderten Versuchsanordnung und bei einem größeren Temperaturbereich bestätigt werden. Bei Temperaturen von + 37° C ist ebenfalls eine starke Evolutionshemmung im Citratmilieu zu beobachten. Man muß hier eine verstärkte Citrathemmung annehmen, wie sie von MARX beschrieben wurde, zumal die Hemmung bei Verdünnung mit Citratplasma stärker ist.

Gleichlaufend im Temperaturbereich von + 2° C bis + 20° C sind die Ergebnisse unter Verwendung von Heparinblut (15 mg %). Wie bei Citratplasma fanden wir an den Thrombozyten neben der Ausbreitungshemmung eine starke Kältepseudopodienbildung, die nach MARX als Reizzustand der Plättchen aufzufassen ist und von KREITER auch im Nativblut gesehen wurde. Bei Temperaturen von + 30° C und + 37° C kommt es zu einer Dissoziation des Evolutionsverhaltens. Bei Verdünnung mit thrombozytenarmen Plasma kommt es hier wie bei Citratplasma zu einer Depression der Evolution, demgegenüber zu einer deutlichen Evolutionssteigerung bei Verdünnung mit isoton. NaCl. Das Verhalten in der Plasmaverdünnung entspricht den Ergebnissen von KREITER bei Verwendung Nativblut. Die stärkere Evolution in NaCl-Verdünnung war bislang nicht beschrieben und ist wohl durch eine relative Verdünnung des Anticoagulans Heparin durch die NaCl-Lösung (1:20) zu deuten. Interessant wäre eine Untersuchung dieses Problems, der Hemmung der Ausbreitung der Plättchen bei 37° C durch Heparin in Abhängigkeit vom

Heparinspiegel, unter Verwendung von Hämophilenblut, welches eine ausreichend lange Gerinnungszeit hat. Hierdurch wäre zu klären, wie weit die stärkere Evolution bei + 37° C dem physiologischen Verhalten entspricht.

2. Bei den Untersuchungen der Thrombozytenfunktion im Normalcitrat Plasma mit Fibrinogenzusätzen ergaben sich nur geringe Veränderungen. Die Ausbreitung zeigte keine signifikanten Veränderungen. GROSSPETER fand bei Zunahme des Plasma-Fibrinogengehaltes eine Zunahme der dynamischen Retention mit stärkerer Agglomeratbildung. Zusammengefaßt können wir sagen, daß bei Fibrinogenzusätzen zum Normalcitrat Plasma keine signifikanten Veränderungen der untersuchten Messwerte eintreten.

3. Von KOWALSKI und Mitarbeitern konnte eine Verminderung der Agglomeration, Adhäsion am Glas und Bindegewebe, sowie eine Verminderung der viskösen Metamorphose im streptasebehandelten Plasma gefunden werden. WIDMER beschreibt eine Verminderung der Adhäsion bei Anwesenheit von Fibrinogenabbauprodukten (FDP). Bei unseren Untersuchungen war zunächst ein Fibrinogenabbau mit Trypsin und Chymotrypsin bewerkstelligt worden. Der Nachweis, daß kein Fibrinogen mehr vorhanden war, wurde durch verschiedene Nachweisverfahren erbracht (Thrombinzeit, modifizierte Euglobulinausfällung). Konzentrationsunabhängig ergab sich dabei eine normale statische Adhäsion bei allen Ansätzen, was ein Hinweis darauf ist, daß die statische Adhäsion bei dieser Methodik nicht durch Plasmafaktoren beeinflußt ist. Die Ausbreitung war in den 1 mg %-Ansätzen von Trypsin und Chymotrypsin am größten. Man muß hier wohl annehmen, daß hier dem Versuchsansatz entsprechend noch großmolekulare Fibrinogenabbauprodukte vorhanden waren, die für die Stimulierung der viskösen Metamorphose ausreichten.

3. Bei der Verwendung von Plasmin zum Fibrinogenabbau und der Gewinnung von FDP wurde eine wesentlich kürzere Inkubationszeit angewendet (5 Minuten gegenüber 30 Minuten bei Trypsin und Chymotrypsin bei Zimmertemperatur). Der Fibrinogenabbau war danach vollständig, soweit mit den verwendeten Methoden nachweisbar. Die statische Adhäsion war auch hier unabhängig von Fibrinogen und Fibrinogenabbauprodukten. Das überraschende bei den Ergebnissen ist die Tatsache, daß Plasmin selbst eine geringe evolutionsfördernde Wirkung besitzt, was vielleicht durch Spuren von Trypsin als Präparatverunreinigung bei der Herstellung sich erklärt. WIDMER stieß im Test-Thrombin ebenfalls auf einen Zusatz, welcher in dem verwendeten Testsystem die Plättchenausbreitung förderte. Bei unseren Versuchen war die Evolution in den FDP und Plasmin enthaltenden Ansätzen signifikant größer als in der reinen Plasminlösung. Dabei fand sich ein Evolutionsmaximum in dem Ansatz mit der höchsten Plasminkonzentration. Welcher Art diese Einwirkung ist, bedarf weiterer Untersuchungen.

4. Bei einem Fall von kongenitaler Afibrinogenämie fanden wir eine Störung der Adhäsion in der Verdünnung des plättchenhaltigen Plasmas mit Citrateigenplasma, während sie in der isotonischen NaCl-Verdünnung normal war, auch mit gewaschenen Plättchen. Die Evolution war sowohl in der Citratplasma- als auch der NaCl-Verdünnung erheblich vermindert. Von CAEN, GUGLER, LÜSCHER und GROSS wird eine fehlende Adhäsion an Glas bei Afibrinogenämie beschrieben, während die Adhäsion an Kollagen und die Aggregation mit ADP normal war. Nach unseren Befunden spricht vieles dafür, daß die statische Adhäsion an Zaponlack von der Plasmazusammensetzung abhängig ist. Es könnte demnach eine schlechte Adhäsion von einer behinderten Sedimentation bei hoher Suspensionsstabilität des Plasmas, einem Plasmafaktor oder vom Citrat selbst abhängig sein. Für die These der erhöhten Suspensionsstabilität

spricht, daß erstens die Adhäsion der gewaschenen Thrombozyten in isoton. NaCl normal war und zweitens bei Patienten mit kongenitaler Afibrinogenämie das Ausbleiben der Blutkörperchensenkungsreaktion beobachtet wird. Die dynamische Adhäsion ist nach Befunden von CROSS, CAEN undGROSS dabei normal. Dem stehen Untersuchungen von GROSSPETER entgegen, der bei einer Afibrinogenämie-Patientin eine schlechte dynamische Adhäsion/Retention fand.

Die Ausbreitung ist sowohl in der NaCl-Verdünnung als auch in der Verdünnung mit thrombozytenfreiem Plasma fast aufgehoben. Diese Befunde wurden auch von GUGLER und LÜSCHER mitgeteilt. Es läßt sich hierbei eine direkte Fibrinogenwirkung ablesen, da nach Substitution dieses Faktors die Ausbreitung prompt normalisiert wird. Gleiche Effekte erzielt man durch Einsetzen von Afibrinogenämie-Thrombozyten in ein blutgruppengleiches Normalplasma.

5. Die Tatsache, daß bei Fructoseintoleranz-Kindern die Ausbreitung gestört war, ließ uns die Frage der Energiebereitstellung der Thrombozyten bei der viskösen Metamorphose aufgreifen. in eingehenden Untersuchungen hatten BETTEX-GALLAND, LÜSCHER und GROSS nachgewiesen, daß für die Bildung energiereichen ATP vor Beginn der viskösen Metamorphose eine Glykolyse stattfindet. Wir konnten hier bestätigen, daß die Ausbreitung gewaschener Thrombozyten nach Zusatz von Glukose deutlich besser ist, als nach Zusatz von Galaktose oder Fructose. Dies ist zu erklären durch den rascher und leichter ablaufenden Abbau von Glukose. Die statische Adhäsion war hierbei nicht gestört und gibt wieder einen Hinweis dafür, daß dazu kein energieverbrauchender Prozeß notwendig ist.

Zusammenfassung

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden methodologische Untersuchungen zum Thrombozytenmetamorphogramm nach MARX, KOEPPEI, KREITER und IBROM hinsichtlich der Temperaturabhängigkeit durchgeführt. Bei Temperaturen gegen + 2° C ergab sich sowohl im Citrat- als auch im Heparinblut eine starke Hemmung der Ausbreitung. Bei Temperaturen gegen + 37° C zeigt sich im Citratblut wiederum eine Evolutionshemmung, während im Heparinblut bei isoton. Kochsalzverdünnung eine Steigerung der Evolution zu beobachten war. Ursachen hierfür werden diskutiert.

Im experimentellen Teil wurde die Funktionsmorphologie der Thrombozyten bei Zusätzen zum Plasma untersucht. Hierbei ergab sich eine nicht signifikante Abnahme der statischen Adhäsion, während die Ausbreitung nicht beeinträchtigt wurde.

Bei Fibrinogenabbau durch Trypsin und Chymotrypsin ergab sich eine Abhängigkeit der Ausbreitung vom Grad des Abbaues. In den Ansätzen mit den geringsten Konzentrationen an Proteasen war die Ausbreitung am besten.

Bei Fibrinogenabbau durch ein Plasminpräparat zeigte sich im Metamorphogramm ein Evolutionsförderung durch die Enzymlösung. Diese Wirkung war im Milieu, welches daneben auch Fibrinogenabbauprodukte enthielt, wesentlich stärker.

Bei einem Fall von Afibrinogenämie wurde nachgewiesen, daß die statische Adhäsion wesentlich von der Plasmazusammensetzung abhängig ist. Diskutiert wurde eine erhöhte Suspensionsstabilität oder das Einwirken des Citrats bei der Adhäsionsverminderung. Die fehlende oder verminderte Plättchen-

ausbreitung bei diesem Krankheitsbild ist durch die Fibrinopenie verursacht und durch Substitution des Faktors in vitro prompt zu normalisieren.

Bei zwei Kindern mit Fructoseintoleranz wurde eine Störung (Verminderung der Plättchenausbreitung gefunden. Untersuchungen mit Glukose, Galaktose und Fructose ließen eine starke Abhängigkeit der Ausbreitung gewaschener Thrombozyten von der Art des Monosaccharides erkennen. Die Ausbreitung war am besten mit Glukose, geringer mit Galktose und am schlechtesten mit Fructose.

Literaturverzeichnis

1. Bettex-Galland, M.
   Lüscher, E. F.
   Studies on the metabolism of human blood platelets in relation to clot retraction
   Thromb. et Diath, Haemorrhag. Vol. IV Nr. 2 1960

2. Bommer W.
   Künzer W.
   Schroer, H.
   Kongenitale Afibrinogenämie Teil 1 und 2
   Ann. paediat. 200, 1963

3. Bounameaux, Y.
   L'accolement des Plaquettes aux fibres sous endo thé liales
   C.R. SOC. Biol. (Paris) 153, 865 (1959)

4. Caen, J. P.
   Is Fibrinogen the Plasma Co-Factor in ADP induced Human Platelet Aggregation Nature, Vol. 205, 1963

5. Caen, J. P.
   Considerations sur l'aalongement du temps des Saignement dans l'afibrinogenämie congenitale Societe francaise d'Hematologie, Seance du 17 juin 1963

6. Cross, M. J.
   Effect of Fibrinogen on the Aggregation of Platelets by Adenosine Diphosphate.
   Thromb. et Diath. Haemorrhag. Vol. XII, 524, 1964

7. Derlath, S.
   Die direkte phasenoptische Thrombozyten und Retikulozytenzählung.
   Ärztliche Forschung, 11, 552, 1956

8. Gross, R.
   Biochemical Basis of Viscous Metamorphoses of Platelets and of Clot Retraction.
   Proceeding of the International Union of Physiological Sciences, XXII International Congress Leiden 1962

9. Gross, R. et al.
   Untersuchungen an einer angeborenen Afibrinogenämie (Zur Rolle der Blutgerinnung bei der Blutstillung)
   Klin. Wochenschrift 41, 14, 1963

10. Grosspeter, K. — Untersuchungen zur Methodik der Bestimmung der dynamischen Adhäsion in vitro bei Gesunden und bei Patienten mit von Willebrand-Jürgens Syndrom. Inaug. Diss., München 1968

11. Gugler, E.
Lüscher, E. F. — Platelet Function in Congenital Afibrinogenemia
Thromb. et Diath. Haemorrhag., Vol. XIV, 1965

12. Hugues, J. — Accolement des plaquettes au collagéne Compt. rend. Soc. Biol. 154: 864, 1960.

13. Ibrom, H. J. — Zur quantitativen Erfassung der extravasalen Metamorphose und zur Färbung oberflächenadhärenter Thrombozyten. Inaug. Diss. München 1962

14. Inceman, S.
Caen, J. P.
Bernard, J. — Aggregation, adhesion und viscous metamorphosis of platelets in congenital fibrinogendeficiencies. J. Lab. Clin. Med. Vol. 68 Nr. 1 1966

15. Jürgens, J.
Beller, K. — Klinischen Methoden der Blutgerinnungsuntersuchung Georg-Thieme-Verlag, 1959

16. Keller, W.
Wiskott, A. — Lehrbuch der Kinderheilkunde Georg-Thieme-Verlag, 1966

17. Köhl, K. — Über die Funktionsmorphologie normaler menschlicher Thrombozyten unter dem Einfluß von Pharmka. Inaug. Diss., München 1957

18. Koufas, A. — Symptomatologie und Prognose der kongenitalen Afibrinogenämie. Inaug. Diss., München 1962.

19. Kowalski, E.
Kopec, M.
Weggrzynowicz, Z. — Influence of Fibrinogen Degradation Products (FDP) on Platelet Aggregation, Adhesivness and viscous Metamorphis. Thromb. et Diath. Haemorrhag. Vol. X, 1964

20. Kreiter, H. — Das Thrombozyten-Metamorphogramm Inaug. Diss., München 1958

21. v. Lengerke, H. J. — Studien über das Thrombozytenmetamorphogramm bei Lebererkrankungen. Inaug. Diss. München 1961

22. Lüscher, E. F. — Platelet aggregation, agglutination adhesion and viscous metamorphosis Thromb. et Diath. Haemorrhag., Vol. XIII, 1964

23. Lüscher, E. F.. — Die Thrombozyten in enzympathologischer Sicht Folia Haematologica N.F. Vol. 6, 1961

24. Lüscher, E. F. — Physiologie und Pathologie der Thrombozyten Schweiz. Med. Wochenschrift 94, 49,1964

25. Marcus, A. J. Zucker, M. B. — The Physiologie of Blood Platelets Gruner & Stratton INC,: new York and London 1965

26. Marx, R. — Zur Methodik der vergleichenden quantitativen Bestimmung der Thrombozytenausbreitung auf genormten Oberflächen Klin. Wochenschrift. Jg. 42 Nr. 13, 1964

27. Marx, R. Derlath, S. — Über eine Methode zur vergleichenden quantitativen Bestimmung der Thrombozytenadhäsivität, Blut, Bd. 3, 1957

28. Marx, R. Ibrom, H. Stanislawski, F. — Die Färbung folien- und glasadhärenter, ausgebreiteter Thrombozyten. Blut, Bd. 6, 1960

29. Marx, R. — Über den Einfluß von Plasma- und Serumfaktoren des normalen Blutes auf die Ausbreitung der Thrombozyten. Klin. Wochenschrift Jg. 42, 650, 1964

30. Marx, R. — Der Thrombozyt Verlag J. F. Lehmann, München 1969

31. Murr, H. O. — Studien über Plättchenadhäsion und Plättchenausbreitung unter besonderer Berücksichtigung von Nephropathien. Inaug. Diss., München 1967

32. Reich, Th. — Idee und Praxis der med. Statistik H. Huber-Verlag, Bern-Stuttgart, 1964

33. Walkter, N. — Untersuchungen über die Thrombozytenadhäsion und -Evolution bei verschiedenen Krankheitsbildern. Inaug. Diss., München 1966

34. Widmer, K. Studien zur Beeinflussung der Thrombozyteneigenschaften Adhäsion Evolution und Agglomeration in vit Inaug. Diss. München 1968.

35. Zach, R. Das Thrombozyten-Metamorphogramm bei thrombozytopathischem Blut unter besonderer Berücksichtigung der Thrombopenien und konserviertem Normalblut. Inaug. Diss., München 1960.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. R. Marx für die Überlassung des Themas und die Bereitwilligkeit, mit der er auftretende Probleme durch Diskussion und Ratschläge lösen half. Er unterwies mich vor allem darin, die komplexen Probleme der Hämostaseologie zu erfassen und deren Relevanz für klinische Aspekte.

Herrn Professor Dr. H. Schwiegk danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Frau A. Meisner bin ich dankbar für die Unterstützung bei den aufgetretenen labortechnischen Fragen und

Fräulein Dr. M. Weinzierl für die freundliche Hilfe und den Rat bei der Durchführung der Versuche, sowie

Fräulein C. Danz für die graphische Darstellung der Ergebnisse.

Durchführung der Arbeit

Juli 1966 - Dezember 1966

September 1967 - Dezember 1968

L e b e n s l a u f

Am 24. März 1942 wurde ich, Henning Loeprecht, als Sohn des prakt. Arztes Dr. med. Karl Loeprecht und dessen Ehefrau, Hilde Loeprecht, geb. Häbe, in Stuttgart / Württemberg, geboren.

Von 1948 bis 1952 besuchte ich die ev. Volksschule in Donauwörth und wechselte anschließend nach bestandener Aufnahmeprüfung an das humanistische Gymnasium in Donauwörth über, wo ich 1961 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1961/62 begann ich das Medizinstudium an der Universität Erlangen-Nürnberg. Dort bestand ich nach dem Wintersemester 1963/64 das Physikum. Nach dem ersten klinischen Semester studierte ich die weiteren klinischen Semester an der Universität München, wo ich im Juli 1967 das Staatsexamen absolvierte.

Von September bis November 1967 und von März bis Ende Dezember 1968 war ich Medizinalassistent an der 1. Medizinischen Universitätsklinik München. An der geburtshilflich-gynäkologischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Donauwörth war ich von November 1967 bis Ende Februar 1968 tätig. Ab Januar 1969 bis zur Erteilung der Approbation im September 1969 war ich Medizinalassistent an der Chirurgischen Klinik der Städt. Krankenanstalten Ulm / Donau. Nach Übernahme der Klinik durch die Universität Ulm bin ich seit der Approbation als Assistenzarzt an der Abteilung II des Departments für Chirurgie.